

**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA
MARÍA**

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA MECÁNICA

VALPARAÍSO – CHILE



**“OPTIMIZACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA MICROALGAL PARA
GENERACIÓN DE BIO COMBUSTIBLE A
PARTIR DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL”**

IGNACIO JAVIER TAPIA TOLOSA

**MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
CIVIL MECÁNICO**

PROFESOR GUÍA :	Dr. GERMÁN AMADOR DÍAZ
PROFESOR CORREFERENTE :	Dr. ALEX FLORES MARADIAGA
PROFESOR CORREFERENTE :	M. S. c. CAMILA MERY

MARZO – 2021

Agradecimientos

A todas las personas que me ayudaron en este proceso educativo y formativo a lo largo del sinfín de años en mi permanencia en la universidad.

A Arlette Arancibia por su infinita paciencia, ayuda y apoyo incondicional durante todos estos años.

Al profesor Dr. Germán Amador por toda su ayuda, tiempo y paciencia en la confección del presente documento, siempre teniendo una impecable disposición y trato hacia mi persona.

Al personal del departamento de Ingeniería Civil Mecánica, en especial a los que trabajan en el Laboratorio de Termodinámica, por toda su ayuda e infinita paciencia. Además de facilitarme el espacio y el poder utilizar los equipos del laboratorio.

Resumen

En el presente trabajo se detalla el proceso de diseñar un experimento orientado a la búsqueda del punto de máxima eficiencia en la producción de masa microalgal en un fotobiorreactor, considerando los factores que tienen una mayor influencia en el crecimiento microalgal. Para lograr esto, se realizó un estudio para determinar las principales variables que influyen el cultivo de microalgas, con el objetivo de seleccionar los factores que se estudiarán en el experimento. Posteriormente se definió un diseño experimental orientado en la búsqueda del punto de operación con la máxima eficiencia de producción de la microalga *Chlorella* spp. Los factores estudiados fueron la cantidad de iluminación y de flujo de aire suministrado, además del tipo de difusor de aire.

El objetivo general del presente estudio se centra en la determinación del punto de máximo rendimiento en la producción de biomasa microalgal a través de ensayos en laboratorio, diseñando un experimento que permita estudiar los efectos de la mayor cantidad de variables posibles en el modelo. Para lograr esto se tienen los objetivos específicos siguientes: En primer lugar, se determina una línea base para la curva de crecimiento de cultivo de microalgas. Además, se determinan los factores más importantes en el cultivo de microalgas a nivel de laboratorios. Finalmente, se diseña e implementa un experimento que permita determinar el punto de máxima eficiencia en la producción de biomasa microalgal.

Posterior al análisis del experimento, se concluyó que los factores estadísticamente significativos fueron la cantidad de iluminación y de flujo de aire suministrado, descartando el difusor de aire. Con estos factores se determinó una zona en la que se obtuvo la máxima producción de masa microalgal. El punto de máxima eficiencia se encontró al utilizar 4 lámparas y 3 mangueras de aire, obteniendo un óptimo de 0,8950 [g/l] de microalgas secas.

Abstract

In this work, the process of designing an experiment aimed at finding the point of maximum efficiency in the production of microalgal mass in a photobiorreactor is detailed, considering the factors that have a greater influence on cell growth. To achieve this, a study was conducted to determine the main variables that influence the microalgae culture, in order to select the factors to be studied in the experiment. After this, an experimental design was defined aimed at finding the point of operation with the maximum production efficiency of the microalgae *Chlorella* spp. The studied factors were the level of illumination and the amount of air flow supplied, in addition to the type of air diffuser.

The general objective of this study is focused on designing the maximum yield point in the production of microalgal biomass through laboratory tests, designing an experiment that allows studying the effects of as many variables as possible in the model. To achieve this, we have the following specific objectives: first, a baseline is determined for the microalgae culture growth curve. In addition, the most important factors in the cultivation of microalgae are determined at laboratory level. Finally, the experiment is designed and implemented to determine the point of maximum efficiency in the production of microalgal biomass.

After the experimental analysis, it was concluded that the statistically significant factors were the level of illumination and the amount of air flow supplied, discarding the air diffuser. With these factors, a zone was determined in which the maximum amount of microalgal mass production was obtained. The maximum efficiency point was found with 4 lamps and 3 air hoses, obtaining an optimum of 0.8950 [g/l] of dry microalgae.

Glosario

BBM	Bold's Basal Medium.
CO ₂	Dióxido de carbono.
D.O	Densidad óptica.
Fbr	Fotobiorreactor.
g	Gramos.
h	Horas.
HRAP	High Rate Algal Ponds.
K	Potasio.
LED	Light emitting diode.
l	Litros.
m	Metros.
min	Minutos.
NPK	Nitrógeno, Fosforo y Potasio.
N	Nitrógeno.
O ₂	Oxígeno.
P	Fosforo.
RGB	Red, Green, Blue.
ufc	Unidades formadoras de colonias.
y	Respuesta de interés que se quiere maximizar.
ϵ	Ruido o error observado en la respuesta y .
$E(y)$	Superficie de respuesta.
x_n	Variables que influyen a una respuesta de interés.
β_i	Coefficientes de regresión.
∇Y	Gradiente de y .
α_1, α_2	Variables naturales.
X_1, X_2	Variables codificadas.

Índice

Agradecimientos	I
Resumen.....	II
Abstract	III
Glosario.....	IV
Índice de figuras.....	VIII
Índice de Tablas	IX
1. Introducción	XII
1.1. Motivación	XII
2. Objetivos	1
2.1. Objetivo General	1
2.2. Objetivos Específicos.....	1
3. Marco teórico	2
3.1. Tipos de sistemas de cultivo.....	4
3.1.1. Producción Fotoautotrófica	5
3.1.2. Producción Heterotrófica	15
3.1.3. Producción Mixotrófica.....	15
3.2. Ventajas y desventajas de algunos tipos de cultivo.....	16
3.2.1. Cultivo abierto (Raceway).....	16
3.2.2. Fotobiorreactor tubular.....	16
3.2.3. Fotobiorreactor de columna.....	16

3.3.	Factores que influncian el cultivo de microalgas	16
3.3.1.	Especie de microalga.....	17
3.3.2.	Temperatura	17
3.3.3.	Luz.....	18
3.3.4.	Mezclado	19
3.3.5.	Nutrientes	20
3.3.6.	pH.....	20
3.3.7.	CO ₂	21
3.3.8.	Oxígeno disuelto	21
3.4.	Estado del Arte de la técnica	22
3.4.1.	Primer estudio	22
3.4.2.	Segundo estudio	23
3.4.3.	Tercer estudio.....	26
3.4.4.	Cuarto estudio	28
3.4.5.	Quinto estudio	30
3.4.6.	Sexto estudio	32
3.4.7.	Séptimo estudio.....	34
3.4.8.	Conclusiones de los ensayos	37
3.5.	Efectos de distintos factores de cultivo para el crecimiento de algas estudiado por distintos autores	38
4.	Metodología	39
4.1.	Diseño experimental.....	40

4.1.1.	Factores Variables	40
4.1.2.	Factores Constantes.....	40
4.1.3.	Rango de experimentación.....	41
4.1.4.	Variable de respuesta	41
4.1.5.	Temperatura de secado de algas recomendado	42
4.2.	Procedimiento	42
4.2.1.	Inicio de cultivo.....	43
4.2.2.	Toma de muestras de cultivo.....	44
4.3.	Equipos principales	45
4.4.	Maximización de la extracción	50
4.4.1.	Metodología de Superficie de Respuesta	50
4.4.2.	Acercamiento de primer orden.....	52
4.4.3.	Método del máximo ascenso	52
4.4.4.	Segunda aproximación lineal	52
5.	Resultados y análisis	54
5.1.	Resultados preliminares	54
5.2.	Línea Base.....	55
5.3.	Selección del Diseño Experimental.....	57
5.4.	Primer diseño experimental.....	57
5.5.	Segundo diseño experimental.....	64
6.	Conclusiones	72
7.	Recomendaciones.....	74

8. Referencias.....	75
Anexos.....	89
Anexo I: Distintos modelos de regresión para el Segundo diseño	89

Índice de figuras

Figura 3.1 Representación de la tasa de crecimiento en cultivos de microalgas (líneas continuas) y concentración de nutrientes (línea discontinua). Adaptado de [18].	3
Figura 3.2 Vista en plano de un estanque tipo Raceway. Adaptado de [19].	7
Figura 3.3 Tres diseños de estanques abiertos. (a) Estanque tipo Raceway, (b) Estanque circular, (c) Estanque sin agitar. Adaptado de [14].	8
Figura 3.4 Fotobiorreactor tubular horizontal. Adaptado de [13].	12
Figura 3.5 Fotobiorreactor tubular de columna vertical con cultivo de <i>Chlorella zofingiensis</i> . Adaptado de [15].	13
Figura 3.6 Fotobiorreactores de placas planas: (a) Inclinado, (b) Vertical. Adaptado de [14].	14
Figura 3.7 Ilustración de la trayectoria de la luz y de los ciclos Luz/Oscuridad. Adaptado de [16].	19
Figura 3.8 Curva de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. Cultivo 1 de 6. Adaptado de [1].	33
Figura 3.9 Curva de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. cultivo 1 y 6. Adaptado de [1].	34
Figura 4.1 Cultivo de microalgas. Figura 4.2 Difusor de aire.	45
Figura 4.3 Lámpara Figura 4.4 Bomba de aire.	46
Figura 4.5 Timer. Figura 4.6 Propipeta.	46
Figura 4.7 Pipeta de 20 [ml].	47
Figura 4.8 Horno. Figura 4.9 Desecador.	47
Figura 4.10 Capsulas Petri con diferentes muestras de microalgas secas.	48
Figura 4.11 Balanza sin muestra.	48

Figura 4.12 Sistemas de fotobiorreactores por bloque.	49
Figura 4.13 Fotobiorreactores con 2 y 3 lámparas respectivamente.	49
Figura 4.14 Fotobiorreactores con 4 y 5 lámparas respectivamente.	50
Figura 4.15 Gráfica de la superficie de respuesta para $E(y)=f(x_1,x_2,\dots,x_n)=\eta$. Adaptado de [12].	51
Figura 4.16 Representación gráfica del Método de Superficie de Respuesta. Adaptado de [12].....	53
Figura 5.1 Crecimiento de masa microalgal en 2 semanas para los Fotobiorreactres A y B.	55
Figura 5.2 Promedio del crecimiento de densidad microalgal en 3 días de cultivo para los ensayos del 1 al 3.....	56
Figura 5.3 Superficie de Respuesta.	59
Figura 5.4 Contornos de la Superficie de Respuesta.....	59
Figura 5.5 Efectos principales.....	65
Figura 5.6 Superficie de Respuesta.	66
Figura 5.7 Contornos de la Superficie de Respuesta.....	66
Figura 5.8 Ruta de máximo ascenso del segundo experimento.....	68
Figura 5.9 Ruta de máximo ascenso con 1[ml] de fertilizante.....	69
Figura 5.10 Comparación de Ruta de máximo ascenso para 0,5[ml] y 1[ml] de fertilizante.....	70
Figura 0.1 Grafica de datos predichos vs medición para modelo que incluye los factores A, B y AA.	93
Figura 0.2 Grafica de datos predichos vs medición para modelo que incluye los factores A y B. ...	93
Figura 0.3 Grafica de datos predichos vs medición para modelo que incluye los factores A y AA. 94	

Índice de Tablas

Tabla 3.1 Factores controlables y NO controlables en el experimento. Adaptado de [3].	22
Tabla 3.2 Factores y rangos de experimentación. Adaptado de [3].	22

Tabla 3.3 Composición de Bold's Basal Medium (BBM). Adaptado de [8].	24
Tabla 3.4 Nombre, combinaciones y cantidad de fertilizante usado. Adaptado de [8].	25
Tabla 3.5 Crecimiento de microalgas en 15 días de cultivo. Adaptado de [1].	33
Tabla 4.1 Factores Constantes, Variables y No Controlables del experimento.	41
Tabla 4.2 Niveles de experimentación.	41
Tabla 4.3 Especificaciones Bomba de aire.	46
Tabla 4.4 Especificaciones Balanza.	48
Tabla 5.1 Crecimiento de masa microalgal en 2 semanas para los Fotobiorreactores A y B.	54
Tabla 5.2 Crecimiento de densidad microalgal en 3 días de cultivo de la Línea Base.	56
Tabla 5.3 Primer diseño experimental.	57
Tabla 5.4 Tabla ANOVA para densidad de masa microalgal.	58
Tabla 5.5 Estadísticas de la regresión.	60
Tabla 5.6 Tabla ANOVA del modelo para densidad de masa microalgal.	60
Tabla 5.7 Análisis de coeficientes de regresión del modelo.	60
Tabla 5.8 Ruta de máximo ascenso.	63
Tabla 5.9 Niveles de experimentación del segundo diseño.	63
Tabla 5.10 Segundo diseño experimental.	64
Tabla 5.11 Tabla ANOVA para densidad de masa microalgal.	65
Tabla 5.12 Estadísticas de la regresión.	67
Tabla 5.13 Tabla ANOVA del modelo para densidad de masa microalgal.	67
Tabla 5.14 Análisis de coeficientes de regresión del modelo.	67
Tabla 5.15 Ruta de máximo ascenso del segundo experimento.	67
Tabla 5.16 Ruta de máximo ascenso con 1[ml] de fertilizante.	69
Tabla 5.17 Comparación de la Línea Base con el Punto Óptimo.	71
Tabla 0.1 Estadísticas de la regresión.	89
Tabla 0.2 Coeficientes de regresión del modelo.	89

Tabla 0.3 Estadísticas de la regresión.	89
Tabla 0.4 Coeficientes de regresión del modelo.	89
Tabla 0.5 Estadísticas de la regresión.	90
Tabla 0.6 Coeficientes de regresión del modelo.	90
Tabla 0.7 Estadísticas de la regresión.	90
Tabla 0.8 Coeficientes de regresión del modelo.	90
Tabla 0.9 Estadísticas de la regresión.	90
Tabla 0.10 Coeficientes de regresión del modelo.	90
Tabla 0.11 Estadísticas de la regresión.	91
Tabla 0.12 Coeficientes de regresión del modelo.	91
Tabla 0.13 Estadísticas de la regresión.	91
Tabla 0.14 Coeficientes de regresión del modelo.	91
Tabla 0.15 Comparación entre modelos.....	91
Tabla 0.16 Datos medidos y predichos de densidad para distintos modelos.....	92
Tabla 0.17 Comparación entre modelos.....	94

1. Introducción

Los sistemas más comunes de cultivo de microalgas son los sistemas abiertos (estanques y canales de recirculación) y los sistemas cerrados o fotobiorreactores. Un biorreactor es un sistema en donde se produce una conversión biológica, por lo tanto, un fotobiorreactor es un reactor en donde algas o microbios tienen un crecimiento mediante una reacción fotobiológica. En estos se tiene un mejor control sobre las condiciones de cultivo y los parámetros de crecimiento, además de contar con un ambiente más seguro, lo que garantiza un menor riesgo a contaminarse con otros organismos externos.

En la presente investigación se detalla el diseño e implementación de un experimento que permita determinar el punto de máxima eficiencia en la producción de biomasa microalgal. En primer lugar, se realizó un estudio donde se muestran todos los sistemas de cultivos existentes, con sus ventajas y desventajas, junto con enseñar los factores que influyen en un cultivo de microalgas, para posteriormente elegir el sistema de cultivo que presente las ventajas más importantes para esta investigación. Posteriormente, se desarrolla y realiza un diseño de experimentos con el fin de determinar los factores más importantes en la producción de la microalga *Chlorella* spp a nivel de laboratorio. Finalmente se define el punto de máxima eficiencia de su producción.

1.1.Motivación

El independizarse del uso de combustibles derivados del petróleo, la necesidad de producir combustibles alternativos y de reducir las emisiones contaminantes relacionadas al uso de éste, han creado un interés por la producción de biodiésel a partir de microalgas.

Es por esto, que la importancia de la investigación radica en determinar los parámetros óptimos de operación para incrementar la producción de microalgas, con los cuales se podrá generar biocombustible. Con esta investigación se está entregando un valioso aporte para el desarrollo de sistemas eficientes de producción de biomasa microalgal para el grupo de investigación en motores y combustibles alternativos GIMCA, los cuales están interesados en explorar la producción de biodiésel a partir de microalgas.

2. Objetivos

2.1.Objetivo General

Determinar el punto de máximo rendimiento en la producción de biomasa microalgal a través de ensayos en laboratorio, diseñando un experimento que permita estudiar los efectos de la mayor cantidad de variables posibles en el modelo.

2.2.Objetivos Específicos

- Determinar una línea base para la curva de crecimiento de cultivo de microalgas.
- Determinar los factores más importantes en el cultivo de microalgas a nivel de laboratorios.
- Diseñar e implementar un experimento que permita determinar el punto de máxima eficiencia en la producción de biomasa microalgal.

3. Marco teórico

Las microalgas son microorganismos microscópicos fotosintéticos, procariontes (no poseen núcleo celular) o eucariontes (con núcleo celular delimitado por una membrana) con ciclos vitales acelerados, que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica, capaces de adaptarse a una gran variedad de ambientes hostiles gracias a su estructura unicelular o multicelular simple [18].

Se encuentran en todos los ecosistemas existentes del planeta, tienen una gran variedad de especies y viven en diferentes condiciones ambientales. Se estima que existen más de 50.000 especies, pero solo se han estudiado y analizado cerca de 30.000 [24]. Tienen un ciclo de crecimiento de unos pocos días, en donde se reproducen ellas mismas mediante la fotosíntesis, convirtiendo la energía lumínica en energía química.

Las microalgas se pueden agrupar según la forma en que se alimentan, estos organismos pueden ser [69]:

- Fotoautótrofo: tienen la capacidad de tomar fotones de la luz del sol como fuente de energía convirtiéndola en energía química, mediante la fotosíntesis.
- Heterótrofo: son organismos que no producen su propio alimento, sino que utilizan compuestos orgánicos como el carbón y diferentes fuentes de energía (química o luz).
- Mixotrófico: son organismos que utilizan la fotosíntesis como la principal fuente de energía, sin embargo, son capaces de obtener energía metabólica tanto de la fotosíntesis como de seres vivos.
- Fotoheterótrofo: son organismos en el que es necesaria la luz para usar compuestos orgánicos como fuente de carbono.

En la Figura 3.1 se muestra la curva de crecimiento típica de algas en donde se ve el crecimiento (línea continua) y la concentración de los nutrientes (línea discontinua), donde se pueden reconocer las cinco fases de crecimiento: (1) fase de adaptación; (2) fase de crecimiento exponencial; (3) fase de crecimiento lineal; (4) fase de crecimiento estacionario, (5) fase de declive o de muerte [18, 20].

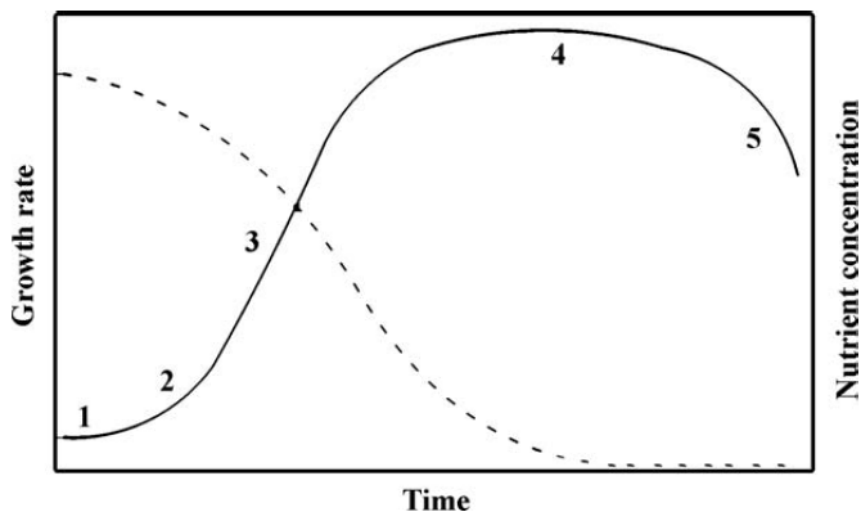


Figura 3.1 Representación de la tasa de crecimiento en cultivos de microalgas (líneas continuas) y concentración de nutrientes (línea discontinua). Adaptado de [18].

Los usos más comunes que tienen las microalgas son los siguientes:

- Nutrición humana. Producción de alimento para animales acuáticos en la acuicultura y animales de ganado.
- Bio fertilizantes.
- Obtención de biomasa a través de distintos procesos químicos en microalgas, con lo que se tendría una obtención más limpia de combustible.
- Captura de CO₂ proveniente de gases industriales, teniendo un amplio potencial de investigación en limpieza de gases del ambiente. Eliminación de CO₂ provenientes de gases de combustión industrial mediante la biofijación [36], reduciendo las

emisiones de gases de efecto invernadero de alguna compañía o proceso al mismo tiempo que se produce biodiésel [37].

- Ayudando en el tratamiento de aguas residuales en la remoción de NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , consiguiendo que el alga se reproduzca consumiendo estos contaminantes como nutrientes [36].
- Posteriormente a la extracción del aceite, la biomasa restante se puede procesar y convertir en etanol, metano o para ser quemado generando energía (electricidad y calefacción) [36].
- Debido a que poseen una variedad de derivados biológicos de alto valor, las microalgas potencialmente pueden revolucionar un gran número de áreas biotecnológicas incluyendo biocombustibles, cosméticos, farmacéuticas, aditivos nutricionales, acuicultura y prevención de la contaminación [32, 38].

3.1. Tipos de sistemas de cultivo

A continuación, se muestran tres tipos distintos de mecanismos de producción de algas, en los que se incluyen producciones fotoautotróficas, heterotróficas y mixotróficas, todos ellos siguen los procesos naturales de crecimiento. La producción fotoautotrófica es una fotosíntesis autotrófica, la producción heterotrófica necesita sustancias orgánicas para estimular el crecimiento, mientras que algunas cepas de algas pueden combinar la fotosíntesis autotrófica y la asimilación heterotrófica de compuestos orgánicos en procesos mixotróficos [19].

3.1.1. Producción Fotoautotrófica

Actualmente la producción fotoautotrófica es el único método que es técnica y económicamente viable para producción a gran escala de biomasa para producción no energética [85]. Dos sistemas característicos son los estanques abiertos y fotobiorreactores cerrados [86]. La viabilidad técnica de cada sistema depende de las características de cada cepa de alga utilizada, además de las condiciones climáticas y el costo de terreno y agua [87].

En los sistemas abiertos, como lagos o estanques, el cultivo está expuesto a la atmosfera, y en los cerrados o fotobiorreactores (PBRs en su sigla en inglés), el cultivo prácticamente no tiene contacto con la atmosfera. Un biorreactor es un sistema en donde se produce una conversión biológica, por lo tanto, un fotobiorreactor es un reactor en donde algas o microbios tienen un crecimiento mediante una reacción fotobiológica. Los sistemas abiertos por lo general son más económicos, fáciles de operar y construir, más duraderos que grandes reactores cerrados y con una gran capacidad de producción cuando se comparan con sistemas cerrados. A pesar de esto, según Richmond [24] los estanques utilizan una mayor cantidad de energía para homogeneizar los nutrientes y el nivel del agua no debe ser mayor a 15[cm] (o 150[l/m²]) para asegurar que las microalgas reciban la cantidad suficiente de luz solar para poder crecer. Las principales desventajas que tienen estos sistemas es que son sensibles a las condiciones ambientales, no se puede tener un control de temperatura ni luz adecuado, además de tener una mayor evaporación del agua del estanque. Si bien pueden producir mayores cantidades de microalgas, necesitan ocupar grandes terrenos y son fácilmente contaminados por bacterias u otras algas. Además de tener problemas para que las algas obtengan el CO₂ del ambiente, ya que solo la superficie del estanque está en contacto con el aire [18].

- **Sistemas de producción de estanques abiertos**

El cultivo de algas en estanques abiertos se ha utilizado desde los años 1950 [86]. Estos sistemas se pueden diferenciar entre depósitos naturales de agua (lagos, lagunas y estanques) y estanques o contenedores artificiales.

Hay dos tipos de estanques abiertos: los “Open Ponds” que, básicamente son grandes estanques poco profundos y los “Raceway” que, además de lo anterior, tienen la capacidad de agregar agitación y mezcla, ayudar al intercambio de gases y hasta llegar a tener un cierto control del pH. Comúnmente se construyen como canales ovalados. Los tres diseños más característicos son los mostrados en la Figura 3.3.

- **Open Ponds**

Son simples estanques o piscinas de baja profundidad, en donde se les introduce los nutrientes adecuados y se dejan crecer. El proceso y los costos de operación son bajos, sin embargo, la productividad y la concentración de biomasa son menores.

- **Raceways**

Los estanques tipo Raceway son los sistemas artificiales más utilizados [88]. Comúnmente se construyen como canales de recirculación en forma ovalada, como un bucle cerrado (Figura 3.2), con una profundidad de entre 0,2 y 0,5[m]. Necesitando una correcta mezcla y circulación para estabilizar el crecimiento del alga y su productividad, esto se logra agregando agitación mecánica mediante una rueda de paletas o “paddle wheel”, la cual además de mezclar el cultivo, lo mantiene en suspensión. En un ciclo de producción continua, el caldo de algas y nutrientes se introducen por delante de la rueda de paletas y circulan por el bucle hasta el punto de extracción de la cosecha. La rueda de paletas funciona de forma

continua para evitar la sedimentación. Los requerimientos de CO₂ de las microalgas se satisfacen con el aire superficial, pero aireadores sumergidos se podrían instalar para mejorar la absorción de CO₂ [89].

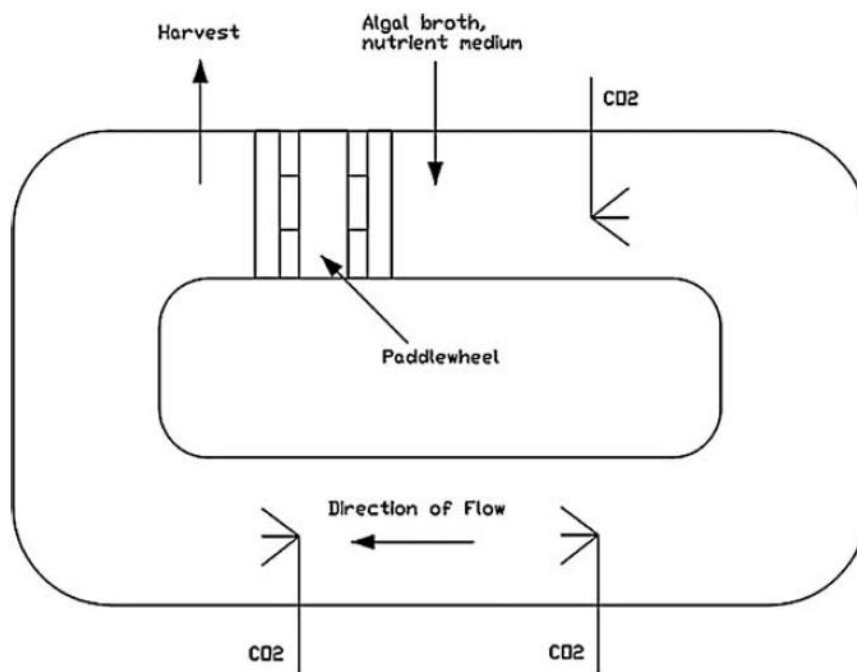


Figura 3.2 Vista en plano de un estanque tipo Raceway. Adaptado de [19].

Comparados con los fotobiorreactores cerrados, los estanques abiertos son la forma más económica de producción de biomasa algal a gran escala. La producción de algas en estanques abiertos no necesariamente compite por el terreno con los cultivos agrícolas existentes, ya que se pueden instalar en áreas con una producción potencial agrícola marginal [90]. Además, tienen un menor consumo energético [80], el mantenimiento y la limpieza son más fáciles [82] y por lo mismo, tienen el potencial de devolver una gran producción neta de energía [80].

Los sistemas de estanques abiertos necesitan ambientes cuidadosamente elegidos debido a la amenaza de contaminación con otras algas y protozoos [81]. Los monocultivos son posibles al mantener un ambiente de cultivo extremo, aunque no todas las especies de algas

se pueden cultivar de esta manera. Asimismo, largos periodos de producción en monocultivos no aseguran la exclusión de contaminantes bacterianos o biológicos [91].

En la productividad de biomasa, los sistemas de estanque abierto son menos eficientes cuando se comparan con fotobiorreactores cerrados [79]. Algunas de las posibles razones son, pérdidas por evaporación, fluctuaciones de temperatura en el medio de crecimiento, deficiencias de CO₂, mal sistema de mezclado y limitaciones de iluminación [79, 82, 83, 92].

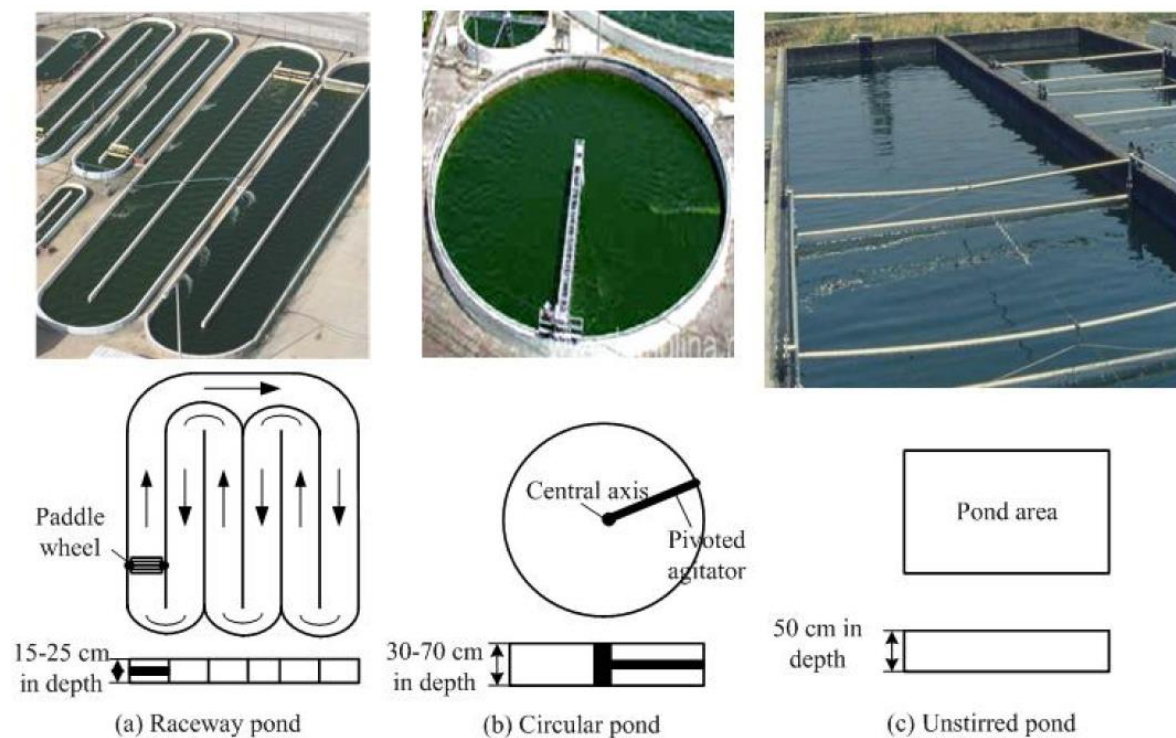


Figura 3.3 Tres diseños de estanques abiertos. (a) Estanque tipo Raceway, (b) Estanque circular, (c) Estanque sin agitar. Adaptado de [14].

- **Sistemas de fotobiorreactores cerrados (FBRs)**

La tecnología de producción de microalgas en fotobiorreactores cerrados se centra en superar la mayoría de los problemas asociados con los sistemas de producción en estanques abiertos [19]. Por ejemplo, los riesgos de polución y contaminación en los sistemas abiertos impiden su uso para preparar productos de alto valor para la industria farmacéutica y cosmética [82]. Por otro lado, los fotobiorreactores permiten el cultivo de especies únicas de microalgas por periodos prolongados con menores riesgos de contaminación [79].

Los fotobiorreactores son sistemas flexibles que se pueden optimizar para adaptarse a las características biológicas y fisiológicas de la especie de microalga que está siendo cultivada, permitiendo que se puedan cultivar especies de algas que no pueden crecer en estanques abiertos. En los fotobiorreactores, el intercambio de gases y contaminantes entre las células del cultivo y la atmosfera es muy limitado o nulo gracias a las paredes del reactor. Además, una importante proporción de la luz no incide directamente en la superficie del cultivo, teniendo que atravesar las paredes transparentes del reactor [18].

Son equipos destinados al cultivo, principalmente de microalgas. Para lograr esto, es necesario mantener un medio lo más estable posible (pH, temperatura, concentración de O₂), además de asegurar los nutrientes y la luz necesaria para un correcto crecimiento. En estos sistemas se tiene un mejor control sobre las condiciones de cultivo y los parámetros de crecimiento, permiten alcanzar altas concentraciones celulares, altas productividades volumétricas, son menos propensos a la evaporación, tienen mejores sistemas de introducción de aire, se tiene un ambiente más seguro y aseguran un menor riesgo a contaminarse con otros organismos externos. Por lo general los fotobiorreactores usados en

laboratorio son iluminados artificialmente mediante lámparas. Dentro de los sistemas cerrados podemos encontrar tubulares, de superficie plana, y fotobiorreactores de columna.

Los fotobiorreactores tienen bastantes ventajas con respecto a los estanques abiertos dependiendo de su diseño o de su forma: se puede tener un mayor control en las condiciones de cultivo y los parámetros de crecimiento (temperatura, iluminación, pH, mezcla, CO₂ y O₂), tienen menores pérdidas de CO₂, menor evaporación, se pueden obtener mayores densidades de microalgas, mayores productividades volumétricas, se cuenta con medio más seguro y protegido, previniendo la contaminación con otros microorganismos.

Dentro de sus mayores desventajas se tiene el calentamiento excesivo, bioincrustación, acumulación de oxígeno, dificultad para escalar, altos costos de construcción y daño celular por esfuerzo cortante [18, 93].

Según Richmond [24] aunque los sistemas cerrados no tienen la ventaja en productividad de área, superan ampliamente a los estanques en productividad volumétrica (8 veces mayor) y la concentración celular (16 veces mayor).

Existen varios tipos de fotobiorreactores, los más comunes son los siguientes.

- **Fotobiorreactores Tubulares**

Los fotobiorreactores consisten en tubos rectos de vidrio o plástico como se muestra en las Figuras 3.4 y 3.5 [82]. Los arreglos tubulares capturan la luz del sol y se pueden colocar de forma horizontal [94], vertical [95], inclinado [96] o con forma de hélice [97], además los tubos son por lo general de 0.1[m] o menor de diámetro [79]. Los cultivos de algas son recirculados o mediante bombas mecánicas o sistemas de Airlift. La agitación y mezcla son muy importantes para asegurar el correcto intercambio de gases en los tubos [19]. Los

fotobiorreactores de placas planas tienen la ventaja en cultivos en masa de tener baja acumulación de oxígeno disuelto y una alta eficiencia fotosintética comparados con los tubulares [99].

Los fotobiorreactores tubulares son considerados más adecuados para el cultivo en masa en exterior ya que tienen una mayor superficie en contacto con la luz del sol.

Los fotobiorreactores con forma de columna tienen la mayor eficiencia en el mezclado, las mayores tasas de transferencias volumétricas de masa y las mejores condiciones de crecimiento controlable [44]. Son compactos, de bajo costo y más fáciles de operar. Las columnas verticales son aireadas desde el fondo e iluminadas a través de sus paredes transparentes [44] o internamente [100]. Su desempeño es comparable con los fotobiorreactores tubulares [101].

Los problemas más comunes que se presentan son la fotoinhibición, la dificultad que existe para controlar la temperatura y que se llegan a altos niveles de oxígeno y CO₂ en el cultivo. Adicionalmente, cuando se quiere escalar este tipo de configuraciones, se aumenta el tamaño de los tubos, lo que provoca una pérdida de área de iluminación del cultivo.

Los tipos de fotobiorreactores tubulares más utilizados son los de tipo serpentín o helicoidales.



Figura 3.4 Fotobiorreactor tubular horizontal. Adaptado de [13].

- **Fotobiorreactores Tubulares tipo serpentin**

Este diseño se compone por tubos transparentes rectos conectados con uniones en U, formando un serpentin, el que se puede colocar de forma horizontal o vertical. La introducción de los nutrientes y el intercambio de gases se produce en un equipo externo a los tubos. El intercambio de gases se produce gracias a una bomba de aire o de un equipo de airlift.

Con este diseño se logra iluminar las microalgas con una alta eficiencia. Por otra parte, se tienen problemas con la longitud de los tubos, ya que se tiende a acumular O_2 , a existir una baja concentración de CO_2 y se tienen distintos valores de pH dentro del cultivo. Junto a lo anterior, se tiene una limitante con el diámetro de los tubos, ya que, al aumentar el diámetro, se pierde luminosidad dentro de estos, con lo que la escalabilidad de estos sistemas se ve afectada.

- **Fotobiorreactores Tubulares helicoidales**

Este diseño se compone por tubos flexibles delgados dispuestos en torno a una estructura vertical, generalmente formando una especie de cilindro con los tubos. La gran desventaja que presenta es el ensuciamiento y crecimiento de algas en las paredes de los tubos.

- **Fotobiorreactores de columna vertical**

Son sistemas en donde se inyecta aire comprimido para lograr el mezclado. Tienen un bajo costo y consumo de energía, son compactos, tienen índices de transferencia de masa altos, alta escalabilidad, se tiene un buen mezclado y son fáciles de esterilizar. Su gran desventaja es que tienen poca superficie de iluminación.



Figura 3.5 Fotobiorreactor tubular de columna vertical con cultivo de *Chlorella zofingiensis*. Adaptado de [15].

- **Fotobiorreactores de placas planas**

La gran ventaja que tienen es su gran superficie de iluminación como se muestra en la Figura 3.6. Se fabrican con materiales transparentes, son aptos para cultivos en el exterior, económicos y fáciles de limpiar. Se pueden operar por largos periodos de tiempo y tienen alta escalabilidad.

Se utiliza un sistema de mezclado con burbujas de aire, con los que puede alcanzar altos índices de productividad. Sus limitaciones más comunes son el control de temperatura, crecimiento en las paredes, el material de soporte y que la escalabilidad requiere muchos compartimentos.



Figura 3.6 Fotobiorreactores de placas planas: (a) Inclinado, (b) Vertical. Adaptado de [14].

- **Sistemas de producción híbridas**

El cultivo híbrido de dos etapas es un método en el que se combinan distintas etapas de crecimiento en fotobiorreactores y en estanques abiertos. La primera etapa es en un fotobiorreactor, en el que las condiciones controladas minimizan la contaminación con otros organismos y favorece una división celular continua. En la segunda etapa de producción se somete a las células a estrés nutricional, lo que produce un aumento en la síntesis del producto lipídico deseado [80,102]. Esta segunda etapa es ideal en sistemas de estanque abierto, debido

al estrés ambiental que ocurre en la transición entre cultivo desde fotobiorreactores a estanques abiertos [19].

3.1.2. Producción Heterotrófica

En la producción heterotrófica las microalgas se alimentan de sustratos de carbono orgánico como glucosa en biorreactores o fermentadores de tanque agitado [19]. El crecimiento de las algas es independiente de la energía de la luz, con lo que se hace mucho más simple de escalar [104]. Estos sistemas tienen un alto grado de control de crecimiento y menores costos de cosecha gracias a las altas densidades de célula logradas [105]. Los costos de instalación son mínimos, aunque el sistema utiliza una mayor cantidad de energía que la producción de microalgas fotosintéticas porque el proceso incluye la producción inicial de fuentes de carbono orgánico por medio del proceso de fotosíntesis [79].

3.1.3. Producción Mixotrófica

Existe una gran cantidad de algas que son capaces de utilizar ambos procesos metabólicos (autotróficos o heterotróficos) para su crecimiento, siendo capaces de alimentarse por fotosíntesis y también por ingesta de material orgánico [106, 107]. Las algas mixotróficas al tener la capacidad de procesar sustratos orgánicos les da la ventaja de no depender de la fotosíntesis, por lo tanto, la luz deja de ser un factor limitante de crecimiento [108] ya que se puede usar tanto la luz como los sustratos orgánicos de carbón para llevar a cabo el crecimiento celular [103]. El crecimiento es influenciado por los suplementos del medio con glucosa durante las fases de luz y oscuridad, por lo tanto, existe menos pérdidas de biomasa durante la fase oscura [108].

3.2. Ventajas y desventajas de algunos tipos de cultivo

3.2.1. Cultivo abierto (Raceway)

Ventajas: Económico, fácil de limpiar, no compite por tierra agrícola, bajo consumo energético rápido mantenimiento.

Desventajas: poca productividad, gran área requerida, cepas limitadas, pobre capacidad de mezclado y aprovechamiento solar, fácil contaminación.

3.2.2. Fotobiorreactor tubular

Ventajas: Amplia iluminación superficial, apto para cultivos exteriores, poco costoso, buena productividad.

Desventajas: Pequeño grado de crecimiento en pared, amplio espacio, gradientes de pH, oxígeno y dióxido de carbono disuelto.

3.2.3. Fotobiorreactor de columna

Ventajas: compacto, alta transferencia másica, bajo consumo energético, buena capacidad de mezcla, fácil control de contaminantes.

Desventajas: Poca área de iluminación, costoso, construcción complicada.

3.3. Factores que influyen en el cultivo de microalgas

Existen varios factores que influyen en el crecimiento de las algas, algunos de los más importantes son los siguientes: factores abióticos¹ como la cantidad y calidad de luz,

¹ Abiótico: “Que es fundamental en un ecosistema e influye en los seres que viven en él”.
Definiciones de Oxford Languages.

temperatura, concentración de nutrientes, O₂, CO₂, pH, salinidad, químicos tóxicos; factores bióticos como los patógenos (bacterias, hongos, virus) y la competición con otras algas; factores operacionales como el cizallamiento producto de la mezcla, tasa de dilución, profundidad, frecuencia de cosecha, y adición de bicarbonato [18].

3.3.1. Especie de microalga

La especie de microalga a cultivar depende principalmente de qué finalidad se desea dar a la biomasa resultante y/o si el cultivo es para fitorremediación² (limpieza de los gases). En sistemas abiertos, las especies de algas que predominan dependen de factores operacionales, ambientales y de parámetros biológicos. En sistemas cerrados es posible obtener cultivos monoespecíficos aislados del ambiente.

En un cultivo para fitorremediación, las microalgas deben cumplir con tres condiciones: alta tolerancia a la variación estacional y diurna si es un sistema abierto; alta tasa de crecimiento; y buena capacidad para formar agregados para una cosecha por simple gravedad. Además, podrían ser deseables que contengan altos niveles de componentes celulares valiosos, como podría ser el contenido de lípidos para la generación de biodiésel.

3.3.2. Temperatura

Para el cultivo de algas, tanto para sistemas cerrados como para sistemas abiertos, la temperatura es el factor limitante más importante después de la iluminación. Muchas microalgas toleran temperaturas hasta 15[°C] por debajo de su óptimo, pero sobrepasar el

² Fitorremediación: “La fitorremediación aprovecha la capacidad de ciertas plantas para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el suelo, aire, agua o sedimentos...” [7].

punto de temperatura óptimo por solo 2 o 4[°C] puede resultar en una total pérdida del cultivo [18,56].

La producción de microalgas aumenta proporcionalmente con el aumento de temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie. Por sobre este punto se reduce la productividad global. La temperatura óptima es distinta dependiendo de con qué especie se esté trabajando, pero por lo general se encuentra entre los 28°C y 35°C.

En un sistema de cultivo cerrado es relativamente fácil controlar la temperatura, ya que se cuenta con distintos mecanismos. Estos mecanismos pueden ser el utilizar el reactor dentro de un invernadero, inmersión del colector solar en piscinas, o rociadores de agua, entre otros. Por otra parte, en sistemas de cultivo abierto se dificulta el control de temperatura, pero se pueden tomar algunas medidas para amortiguar los efectos del cambio de ésta, como cubrir los estanques con plásticos transparentes.

3.3.3. Luz

Una de las variables más importantes que hay que considerar en un cultivo es la intensidad lumínica. Si no existe una limitación por nutrientes, al aumentar la intensidad lumínica, se aumenta la fotosíntesis en el cultivo hasta alcanzar la tasa máxima de crecimiento para cada especie en el punto de saturación por luz. Si este punto es sobrepasado, se llega a un punto de fotoinhibición, en donde se obtienen resultados negativos para la célula, llegando incluso a su muerte, disminuyendo eficiencia fotosintética y productividad del cultivo.

Uno de los problemas más significativos en cultivos microalgales exteriores es sufrir de fotoinhibición en las principales horas del día a causa de la alta intensidad lumínica. Para

algunas condiciones, los cultivos con una densidad celular mayor a 3 g/L utilizan la luz incidente de una forma más eficiente, ya que ocurre un fenómeno de autosombreado, en donde las células que se encuentran más cerca de la superficie dan sombra a las capas inferiores, a las células que están más alejadas de la superficie (Figura 3.7). Es por esto la importancia de un sistema de mezcla eficiente, permitiendo un acceso periódico de todas las células a la luz. Esto es de vital importancia, debido a que la intensidad lumínica decrece con el aumento de la turbidez.

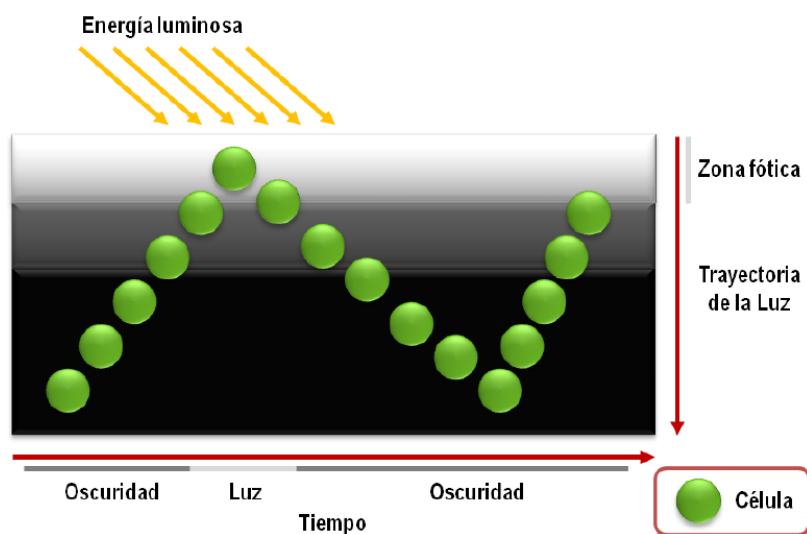


Figura 3.7 Ilustración de la trayectoria de la luz y de los ciclos Luz/Oscuridad. Adaptado de [16].

3.3.4. Mezclado

Otro parámetro de crecimiento importante es el mezclado, ya que homogeniza la distribución de las células, el calor, y facilita la transferencia de gases. Además, un cierto grado de turbulencia es deseado para facilitar la circulación de microalgas de las zonas más oscuras a las más cercanas a la fuente de luz del reactor [70]. Sin embargo, si la velocidad del fluido y los grados de turbulencia son demasiado altos, las microalgas pueden resultar dañadas por esfuerzos cortantes [44].

Existen sistemas de HRAP (High Rate Algal Ponds), en donde el mecanismo de paletas ofrece una mezcla vertical eficiente, lo que permite una exposición intermitente de luz a las células del cultivo.

3.3.5. Nutrientes

El nutriente más importante para las microalgas después del carbono es el nitrógeno, y se agrega como nitrato (NO_3^-) o como amonio (NH_4^+).

El nitrógeno también es un factor crítico para la regulación del contenido de lípidos en las microalgas. Generalmente, las microalgas tienen un contenido de lípidos del 20% aproximadamente, pero cuando el nitrógeno es el factor limitante del crecimiento, la acumulación de los niveles de lípidos aumenta en más de 40%. No obstante, al limitar la cantidad de nitrógeno para favorecer la acumulación de lípidos en las algas, por lo general se disminuye la producción de estas, por lo que obtener estas dos condiciones, alto contenido en lípidos y una alta producción de algas, pueden ser mutuamente excluyentes.

Por otro lado, el fósforo es un elemento fundamental en muchos procesos celulares. Aunque el contenido de fosforo en las microalgas es menor al 1%, su ausencia en el cultivo es una de las más grandes limitaciones para el crecimiento. En los medios de cultivo por lo general se agregan en forma de HPO_4^{2-} o HPO_4^- .

3.3.6. pH

Dentro de los factores más importantes en la determinación del pH de un cultivo podemos nombrar la producción microalgal, la actividad microbiana autótrofa y heterótrofa, la eficiencia del sistema de adición de CO_2 , la respiración y la alcalinidad y composición iónica del medio de cultivo.

Para cada especie se necesita un rango específico de pH para un crecimiento óptimo, siendo pH 8 el más indicado para especies dulceacuícolas. Para valores sobre o debajo de este punto se presenta un descenso en la productividad, que además de afectar el crecimiento de las algas, disminuye la capacidad de remover el nitrógeno en sistemas de tratamientos de aguas.

El pH del cultivo se puede controlar con un sistema automatizado de inyección de CO₂, o agregando ácido o base permitiendo, además, suministrar CO₂ necesario para cultivos de alta productividad.

3.3.7. CO₂

La necesidad de CO₂ puede ser considerable, por lo que un cultivo comercial podría llegar a tener un costo asociado elevado. De aquí nace la necesidad de encontrar una forma económica para mitigar dichos costos. De esta forma, se han llevado a cabo diversos estudios sobre las capacidades de distintas microalgas para la fijación de CO₂ provenientes de diferentes fuentes gaseosas, considerándose altamente eficientes en este proceso.

Se ha demostrado que la adición de CO₂ aumenta la productividad en HRAPs en tratamiento de aguas residuales a escala experimental, llegando a mejorar la productividad a más del doble.

3.3.8. Oxígeno disuelto

En sistemas de cultivo, la intensa fotosíntesis realizada durante el día puede aumentar los niveles de oxígeno disuelto a saturación mayor al 200%. Se piensa que una elevada saturación podría afectar la producción de algas.

3.4.Estado del Arte de la técnica

Con base a la información recopilada de la técnica, se destacan los siguientes trabajos:

3.4.1. Primer estudio

Oscar Puro en su trabajo “Diseño de un fotobiorreactor para optimizar la producción de microalgas” [3] en su elaboración del diseño de un fotobiorreactor para la microalga *Chaetoceros gracilis*, se utiliza un medio de cultivo Conway. Se evalúa el uso de Columna de burbujas vs Airlift con cilindro concéntrico o cilindro dividido. Decidiéndose por un sistema Airlift con cilindro concéntrico.

Tabla 3.1 Factores controlables y NO controlables en el experimento. Adaptado de [3].

Factores Controlables	Factores NO Controlables
Nivel de iluminación	Temperatura ambiente
Tipo de aspersor	Salinidad del agua
Cantidad de CO ₂ suministrado	Presencia de otros microorganismos en el cultivo
Flujo de aire	
Fotoperiodo de cultivo	
Nutrientes suministrados (medio de cultivo)	
Frecuencia de suministro de CO ₂	

Tabla 3.2 Factores y rangos de experimentación. Adaptado de [3].

Factor	Rango de Experimentación
A: Nivel de iluminación	2 – 8 Luces
B: Cantidad de CO ₂ suministrada por día	30 – 100 g
C: Aspersor	Tipo I – Tipo II
D: Fotoperiodo	18 – 24 h
E: Flujo de aire	1 – 5 L/min

En el presente trabajo se determinó que los fotobiorreactores de columna vertical eran la alternativa más adecuada. El fotobiorreactor de columna vertical de tipo airlift con cilindro concéntrico garantizaron un buen mezclado y un correcto ciclo entre luz y oscuridad de las células.

Resultados.

El análisis demostró que los factores estadísticamente significativos fueron el nivel de iluminación y la cantidad de CO₂ suministrada al cultivo. Además, el tipo de aspersor no resultó estadísticamente significativo. El fotoperíodo del cultivo tampoco resultó significativo y se concluye que se podría utilizar un fotoperíodo de 18:6 para lograr un ahorro energético. Finalmente, se observó que el pH del cultivo tiene una estrecha relación con la densidad celular resultante el día posterior.

3.4.2. Segundo estudio

Subhendu Datta, Bijay Kali Mahapatra y Sukham Munilkumar con su trabajo “Culture of *Chlorella* spp through Replacement of Expensive Pure Nutritive Media with Low Cost Commercial Fertilizers” [8] se realizaron tres experimentos con un cultivo de *Chlorella* spp pura en una solución de BBM.

Tabla 3.3 Composición de Bold's Basal Medium (BBM). Adaptado de [8].

Solution No.	Chemical Name	Formula	Weight (g)	Distilled water (ml)
1	Dipotassium hydrogen orthophosphate	K_2HPO_4	3.75	500
2	Potassium di-hydrogen orthophosphate	KH_2PO_4	8.75	500
3	Magnesium sulphate	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.75	500
4	Sodium Nitrate	$NaNO_3$	12.5	500
5	Calcium chloride	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.25	500
6	Sodium Chloride	$NaCl$	1.25	500
7	EDTA tetra sodium salt	$EDTA-Na_4$	10.00	200
	Potassium hydroxide	KOH	6.2	
8	Ferrous sulfate	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.996	200
	Sulphuric acid conc (wt per ml, = 1.84g)	H_2SO_4		
9	Boric acid*	H_2BO_3	0.2 ml	200
10	Zinc sulphate	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.412	100
11	Manganese chloride	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.232	100
12	Cupric sulphate	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.252	100
13	Cobaltous nitrate	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.08	100

En el 1er experimento se usa como fertilizante Urea (46%N), SSP (16% P₂O₅) y MOP (60% K⁺) en un ratio de 12:6:4 (N:P:K). Iluminando con una luz blanca fluorescente y una temperatura de 25 +- 2 [°C]. En el 2do experimento se usa como fertilizante CAN (31% N), DAP (18% NH₄) y MOP (60% K⁺) en un ratio de 12:6:4 (N:P:K). En el 3er experimento como fertilizante se usa Urea:SSP:MOP en un ratio de 12:6:4 como nutrientes. Los estanques se mantienen abiertos exposición de luz de sol outdoor. La temperatura se mantiene entre 30-35°C.

Tabla 3.4 Nombre, combinaciones y cantidad de fertilizante usado. Adaptado de [8].

Experiment No.	N:P:K ratio	Type & quantity of the fertilizers used
1st experiment (5L Glass container)	12:6:4	1.10g urea, 1.6 g SSP, 0.28g MOP
2nd experiment (SL Glass container)	12:6:4	1.53 g CAN, 0.55g DAP, 0.28 g MOP
3rd experiment (150 L fiber tanks)	12:6:4	22.17 g Urea 32 g SSP 5.68 g MOP

Resultados.

El primer experimento fue el que mejores resultados arrojó. La producción de *Chlorella* 2.95×10^6 Cells/ml después de 7 días y con una pureza de 76.6% (con respecto a otros fitopláctones). El segundo experimento obtuvo una pureza de 70% de *Chlorella* pura. El tercer experimento, la producción de *Chlorella* de 0.6×10^6 Cells/ml después de 7 días de crecimiento con una pureza del 7%. Como la Urea contiene 46% de N y CAN 25% de N, además SSP contiene 16% P y DAP 46% P, la producción en el experimento 1 fue mayor a la del 2.

En el experimento 3, la producción no fue satisfactoria ya que existió una fluctuación de temperatura. Experimentación previa muestra que la temperatura óptima para producción de biomasa es de 30[°C], y aumentar por encima de dicho punto resulta en una continua disminución del crecimiento de las microalgas [119]. Ya que el experimento se realizó en época de verano, la temperatura del cultivo fue mayor a 30[°C] durante el día. Este pudo ser el factor de mayor importancia en el bajo crecimiento de *Chlorella* en condiciones outdoor.

Con el presente estudio se puede concluir que *Chlorella* spp (principalmente *Chlorella* pyrenoidosa) puede ser producida efectivamente usando fertilizantes comerciales como la urea, SSP y MOP en ratios de 12:6:4, y que dichos fertilizantes tienen el potencial para reemplazar a los costosos medios nutritivos usados comúnmente en laboratorios alrededor del mundo para la producción de *Chlorella* spp.

3.4.3. Tercer estudio

En el estudio “Cultivo y elaboración de un producto comestible de *Chlorella vulgaris*” [9] se trabaja con un cultivo de *Chlorella vulgaris* y se evaluaron tres medios microalgales: Basal de Bold (BBM), Chu No. 10 y Solución Nutritiva Knop. Dos de sus objetivos generales son: Identificar en que medio de cultivo crece con mayor rapidez la microalga *Chlorella vulgaris* y determinar la tasa de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes medios de cultivo.

Un cultivo se puede definir como un ambiente artificial en el que las algas crecen, las condiciones de cultivo deben ser similares al ambiente natural de cada alga. Cada cultivo tiene tres componentes: un medio de cultivo, el que se contiene en un recipiente determinado; algas creciendo en el medio y el aire, que permite el intercambio de gases entre el medio y la atmósfera. Para los tres medios de cultivos utilizados se tienen distintas cantidades de reactivos, los que se detallan a continuación:

- Medio 1 utilizado: “Medio Basal de Bold (BBM)”.

Componente	Por litro
KH ₂ PO ₄	175 mg
CaCl ₂	25 mg
MgSO ₄	75 mg
NaNO ₃	250 mg
K ₂ HPO ₄	75 mg
NaCl	25 mg
H ₃ BO ₃	11,42 mg
Solución de microelementos	1 ml
Solución 1	1 ml
Solución 2	1 ml

Solución de Microelementos	
Componente	g/litro
ZnSO ₄	8,82
MnCl ₂	1,44
MoO ₃	0,71
CuSO ₄	1,57
Co(NO ₃) ₂	0,49

Solución 1	
Componente	g/litro
Na ₂ EDTA	50
KOH	3,1

Solución 2	
Componente	Por litro
FeSO ₄	4,98
H ₂ SO ₄ (Conc.)	1 ml

- Medio 2: “Medio Chu No. 10”

Componente	Gramos/litro
Ca(NO ₃) ₂	0,04
K ₂ HPO ₄	0,01
Na ₂ CO ₃	0,02
MgSO ₄	0,025
Na ₂ SiO ₃	0,025
Citrato de Fierro Amoniacal	0,005

- Medio 3: “Solución Nutritiva Knop”

Componente	Gramos/litro
KNO ₃	0,2
Ca (NO ₃) ₂	0,8
KH ₂ PO ₄	0,2
MgSO ₄	0,2
Citrato de Fierro Amoniacal	0,1

Cada cultivo se colocó en un recipiente transparente de 2 litros y 5[ml] de microalga respectivamente. Se les colocó una bomba de aire para evitar sedimentación y permitir homogenización de nutrientes. Se hizo un conteo en el día 0, 21 y 28 tomando una gota de cada medio de cultivo y evaluando la densidad celular [células/ml], siguiendo el método del hemocitómetro, utilizando una cámara de Neubauer.

Resultados.

- Se obtuvo un mayor crecimiento en el medio Bold's Basal con una velocidad de crecimiento de 0,541 divisiones por día, debido a la cantidad de nutrientes que posee. A pesar de ello no se logró obtener una división completa al día y las células tardaron en duplicarse casi 9 días.
- Se observó un buen crecimiento en la solución Knop, cuya cantidad de nutrientes es mucho menor que la del medio Bold's Basal. Su tiempo de duplicación fue de 11 días y no se logró una división completa al día.
- En el medio Chu No. 10 se observó una velocidad de crecimiento mayor, pero al término de las tres semanas no se encontró ninguna célula, probablemente porque el medio "Chu No. 10" promueve un buen crecimiento en bajas concentraciones de células, pero puede exhibir deficiencias cuando hay una mayor densidad de células [113].

3.4.4. Cuarto estudio

Martha Ortiz Moreno en su estudio "Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas" [2] se trabaja con un cultivo de *Chlorella sorokiniana*. Utilizando cuatro

medios de cultivo microalgales. Se hacen medios Sueoka, Guillard, Remital (fertilizante NPK: 1, 2, 3, 4, 5 g/l) y lixiviado de gallinaza (con concentraciones del 30, 50 y 80%). Registrándose una densidad celular máxima en medio Remital de $86,5 \cdot 10^7$ [celulas/ml] y una velocidad específica de crecimiento media de 0,3 generaciones/día. Las pruebas estadísticas Tukey y Fisher indicaron que el Remital fue el mejor medio de cultivo y las condiciones autotróficas fueron ideales para el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*. Se usa gallinaza procedente de la granja avícola Bonanza ubicada en zona rural de la ciudad de Villavicencio. El filtrado se dispuso en dosis de 30, 50 y 80% en el medio de cultivo y se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 min.

- **Comparación entre los medios de cultivo Sueoka, Guillard y el lixiviado de gallinaza.**

En el primer ensayo se comparó los medios de cultivo Sueoka, Guillard y el lixiviado de gallinaza en las distintas concentraciones (30, 50, 80%). Se llega a la conclusión que el medio Guillard superó ampliamente las demás fuentes de nutrición.

- **Comparación entre los medios Remital, Guillard y lixiviado de gallinaza.**

Se contrasta el medio Remital con Guillard y lixiviado de gallinaza. El estudio estadístico indica que el mejor medio de cultivo es Remital, seguido por Guillard y los medios con lixiviado de gallinaza tienen un comportamiento similar entre sí proporcionando una menor densidad celular de *Chlorella sorokiniana*.

Fisher indica que el mejor medio de cultivo es Remital, seguido por Guillard, los medios con lixiviado de gallinaza proporcionan menor densidad celular de *C. sorokiniana*.

- **Evaluación del efecto de la concentración del Remital en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*.**

Con el objetivo de encontrar la concentración de Remital que entregue el mayor crecimiento de *Chlorella sorokiniana*, se realizaron ensayos variándola de: 1, 2, 3, 4 y 5 g/l. Con el experimento se demostró que al aumentar la concentración de Remital, se presentaba una mayor densidad celular, sin embargo, el ANOVA indicó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Resultados.

El medio de cultivo Remital presento las mejores condiciones para el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana*, comparado con los medios Guillard, Sueoka (condición autotrófica) y lixivado de gallinaza (condición mixotrófica). Además, el medio Remital permite un rápido crecimiento celular, en bajas concentraciones (1 [g/l]). Por lo tanto, puede ser promisorio para la producción masiva de biomasa de *C. sorokiniana* con fines industriales.

3.4.5. Quinto estudio

Facundo Facundo y Liliana Beatriz Moraña con su estudio “Aislamiento, identificación y cultivo de *Chlorella vulgaris* con potencial para suplemento nutricional de peces” [6] trabaja con *Chlorella vulgaris* de la laguna Catal, en el Salar del Hombre Muerto, ubicado en la Puna del noroeste argentino. Utilizando como medios microalgales el Medio Sintético de Bold y Gallinaza de Codorniz.

El objetivo del estudio fue evaluar la producción de biomasa y pigmentos de una cepa autóctona de *Chlorella vulgaris* en dos medios de cultivo (Bold = TB y Gallinaza = TG) con

el fin de obtener una microalga autóctona con potencial para la producción de suplementos dietarios para acuacultura.

Se estudiaron dos tratamientos diferentes: TB = Medio Sintético de Bold (Bischoff y Bold, 1963) y TG = Gallinaza de Codorniz diluida en agua destilada. En el medio de Bold la concentración final de nutrientes es de 0,02 [g/l] de nitrógeno y de 0,02 [g/l] de fósforo (Relación N/P 1:1). El estiércol de codorniz posee una concentración final de 30 gramos de nitrógeno y 4,36 gramos de fosforo por cada 1000 gramos de gallinaza. Se diluyo con agua destilada hasta obtener una concentración final de 0,02 g/l de fosforo y la de nitrógeno de 0,138 g/l (Relación N/P = 6,88:1).

De cada tratamiento se realizaron 4 réplicas. Previo a la inoculación con las algas, los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 120[°C] y 1 [atm]. Luego se inocularon *Chlorella vulgaris* en una concentración de 3500 [ind/ml] en cada replica. Las réplicas se ubicaron con luz constante (lámparas fluorescentes de 72 [Watts]) y temperatura de 24+-1 [°C]. Luego de 9 días de incubación, se midieron: Concentración de pigmentos y producción de biomasa (peso seco de algas).

Resultados.

El TG apporto mayores productividades de biomasa de *Chlorella vulgaris*. Resultados similares se habían obtenido en estudios previos que demostraron que con el uso de estiércoles se obtiene una mayor producción y un menor costo que en aquellos medios que son específicos para el cultivo de microalgas [114]. La mínima producción de peso seco se registró en una réplica de TB, y la máxima se encontró en una réplica del TG. Las mayores producciones de clorofilas a y b se obtuvieron al utilizar TG.

El análisis demostró que el TG apporto mayores productividades de biomasa y pigmentos de *Chlorella vulgaris*. Se observó una mayor producción de carotenoides al utilizar el medio con estiércol de codorniz. El TG siempre mostró un incremento en la producción de biomasa y de pigmentos (carotenoides y clorofilas a y b), en comparación con el TB. Una posible explicación a los mayores rendimientos en medios con desechos orgánicos es la capacidad de alimentación mixotrófica de la *Chlorella*, en estudios anteriores de crecimiento de microalgas sugieren una mayor productividad en microalgas mixotróficas que en autotróficas [115].

3.4.6. Sexto estudio

Cherlys Infante en su estudio “Propagación de la microalga *Chlorella* sp en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular” [1] se trabaja con un cultivo de *Chlorella* sp. Utilizando fertilizante comercial. Concentración de 4[ml] de N, a partir de un fertilizante comercial, este fue distribuido en seis recipientes de vidrio de 5[l] y se esterilizo en autoclave durante 15[min] a 121[°C]. en cada recipiente se inoculó con 1×10^6 [ufc] de microalgas de una suspensión de un cultivo puro de *Chlorella* sp con densidad óptica (D.O) de 0,1. Los cultivos se mantuvieron a 30[°C], con aireación y en presencia de la luz durante 15 días, fotoperiodo de 12:12[h]. la iluminación fue suministrada con lámparas fluorescentes a todos los cultivos. Los procesos estuvieron en constante agitación mediante bombas de aire, las cuales proporcionan 2,25[lO₂/min] para evitar sedimentación de las algas y permitir su homogenización en el reactor.

El crecimiento se determinó mediante turbidimetría a 660[nm], utilizando un espectrofotómetro Cole Parmer modelo s2100uv+, monitoreando cada cultivo en intervalos

fijos de 24 horas. La Figura 3.8 muestra el comportamiento de la cinética del crecimiento celular, mostrando un comportamiento lineal.

Tabla 3.5 Crecimiento de microalgas en 15 días de cultivo. Adaptado de [1].

Días \ cultivo	1	2	3	4	5	6
1	0,12	0,112	0,1	0,11	0,106	0,121
2	0,133	0,146	0,128	0,134	0,137	0,148
3	0,222	0,22	0,171	0,173	0,22	0,221
4	0,307	0,301	0,242	0,252	0,302	0,29
5	0,392	0,383	0,313	0,331	0,384	0,36
6	0,434	0,46	0,34	0,44	0,507	0,511
7	0,524	0,547	0,518	0,484	0,534	0,535
8	0,648	0,641	0,595	0,568	0,629	0,628
9	0,772	0,736	0,673	0,652	0,725	0,722
10	0,875	0,857	0,797	0,779	0,758	0,759
11	0,958	0,941	0,878	0,82	0,84	0,824
12	1,042	1,025	0,959	0,861	0,923	0,89
13	1,097	1,07	0,991	0,901	1,028	0,999
14	1,128	1,115	1,059	0,939	1,034	1,025
15	1,186	1,126	1,149	1,072	1,111	1,091

La Figura 3.9 muestra el crecimiento celular en los cultivos 1 y 6 con líneas de tendencia exponencial y lineal.

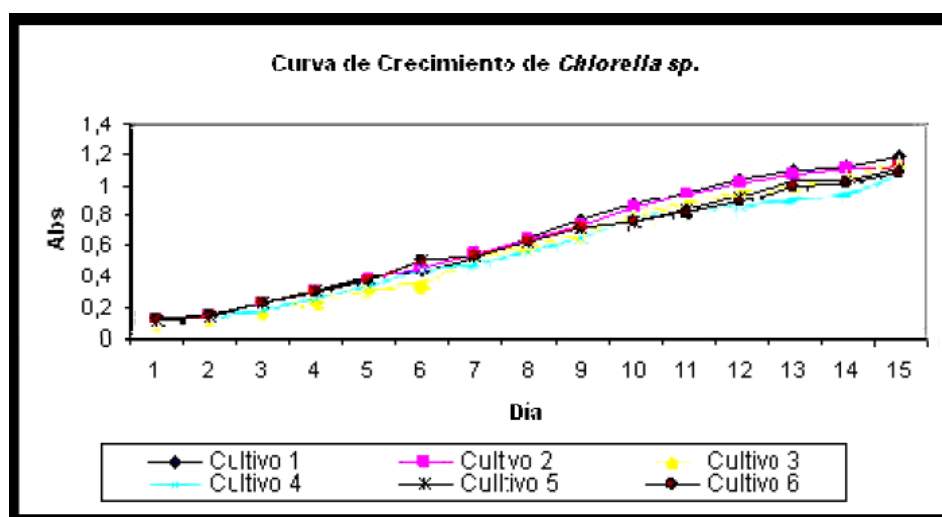


Figura 3.8 Curva de crecimiento de *Chlorella* sp. Cultivo 1 de 6. Adaptado de [1].

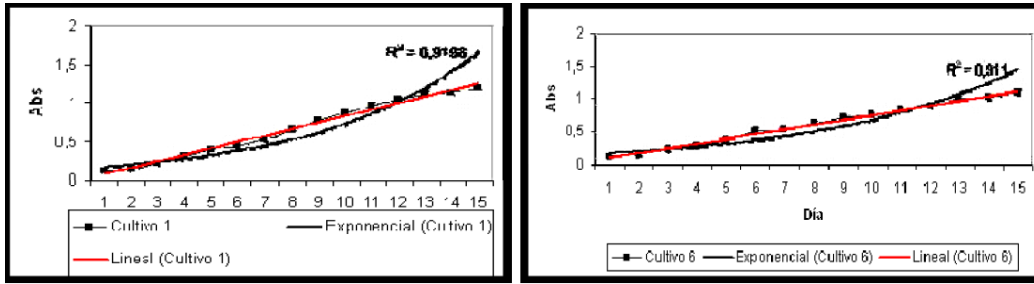


Figura 3.9 Curva de crecimiento de Chlorella sp. cultivo 1 y 6. Adaptado de [1].

Los resultados de este ensayo dieron un crecimiento con una tendencia lineal, estos resultados son muy parecidos a los obtenidos por:

- Kastanek [116], cultivando esta microalga utilizando como fuente de carbono el CO₂ de una unidad de cogeneración. El crecimiento celular, expresado como peso seco mostró un comportamiento lineal.
- Bashan [117], realizando un cultivo por lote con algas de este mismo género, utilizando agua residual sintética como medio de propagación y co-inmovilización en esferas de alginato, también mostro un crecimiento de tipo lineal.
- El comportamiento también es similar al observado por Chiu [118], quien realizó cultivos por lote de Chlorella sp. en fotobiorreactores aireados por ocho días.

Resultados

El cultivo por lotes resulta adecuado para la obtención de biomasa de Chlorella sp observándose un ajuste lineal para la cinética de crecimiento, además se demuestra que es posible utilizar fertilizantes comerciales para el cultivo de microalgas.

3.4.7. Séptimo estudio

Daniel Fozer con su estudio “Improvement of microalgae biomass productivity and subsequent biogas yield of hydrothermal gasification via optimization of illumination” [120]

se examinaron los efectos de la luz en el cultivo de *Chlorella vulgaris* bajo distintas longitudes de onda e intensidades de luz. Diodos emisores de luz RGB se aplican en fotobiorreactores con diferentes longitudes de onda y colores. La mayor productividad de biomasa se encontró en 243,5 y 96,8 μmol para los colores rojo y azul.

Las microalgas se cultivaron en un medio BG11 con la siguiente composición: NaNO_3 1500[g/l]; K_2HPO_4 0,040[g/l]; MgSO_4 7[g/l], H_2O 0,075[g/l]; CaCl_2 2[g/l], H_2O 0,036[g/l], Ácido Cítrico 0,006[g/l]; $\text{FeNH}_4 \text{SO}_4$ 0,006[g/l]; EDTANa_2 0,001[g/l]; Na_2CO_3 0,020[g/l] y 1[ml] de Solución A5.

Se examinaron seis distintas variaciones en el ajuste de luz (longitud de onda y/o intensidad) al mismo tiempo. Los experimentos tuvieron un periodo de luz y sombra de 16:8 horas. El mezclado de las células se llevó a cabo por medio de una incubadora con agitación (Innova 40, New Brunswick Scientific) con una temperatura constante de 25[°C] y a una velocidad de 250[rpm]. La fermentación llevo 14 días, donde la concentración de biomasa se fue monitoreando todos los días por medición de densidad óptica.

La fermentación en el laboratorio se llevó a cabo en un estanque agitado con un volumen de trabajo de 2 litros. La plataforma de iluminación RGB-LED es proporcionada por la Colección de Cultivo de Algas UTEX de La Universidad de Texas en Austin con los siguientes colores: rojo (626 nm), verde (525 nm) y azul (470 nm). Las luces LED y su intensidad se puede ajustar con un controlador. El periodo de iluminación se controla con un Timer para asegurar un periodo de luz y oscuridad de 16:8. El mezclado del cultivo se logró con un agitador magnético (IKA). La temperatura del reactor se mantuvo en 25[°C] y el agitador magnético en 250[rpm].

Para determinar la longitud de onda de iluminación ideal, se consideraron 6 niveles de configuración, en donde los colores elegidos fueron tres básicos: rojo (626 nm), verde (525 nm) y azul (470 nm); y tres mezclados: amarillo (626 nm y 525 nm), aguamarina (525 nm y 470 nm) y morado (626 nm y 470 nm).

Resultados

El mayor peso de microalgas secas se obtuvo, en el siguiente orden morado > amarillo > azul verdoso > blanco, lo que concuerda con el hecho de que los picos de absorción de pigmentos de clorofila se encuentran en el intervalo del rojo y azul, por lo que se puede obtener una mayor eficiencia fotosintética usando más opciones de longitud de onda en el cultivo de microalgas.

La más alta productividad se consigue con la irradiación de luz morada, la que es 49,9% más alta que iluminar el cultivo con luz blanca. La productividad más baja se relaciona con el color verde, lo que hace que esta longitud de onda sea inadecuada para incrementar la productividad de la biomasa de *Chlorella vulgaris*. Los mismos resultados fueron descritos con *Nannochloropsis salina* y *Nannochloropsis oculata* [21]. Los resultados sugieren que los colores mezclados obtienen una mayor productividad de biomasa en comparación con la irradiación monocromática, esto está de acuerdo con los estudios de Schulze [98], el que propone la aplicación de LEDs dicromáticos para *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis chuii*. En este estudio las productividades más altas de biomasa se relacionan con LEDs dicromáticos rojo y azul, sin embargo, en el estudio de Mooij [5], para esta configuración se encontraron las más bajas productividades para *Chlamydomonas reinhardtii*, lo que sugiere que, dependiendo de la cepa de microalga, se tienen distintas condiciones de luz óptima.

3.4.8. Conclusiones de los ensayos

En los distintos estudios que se han hecho sobre cultivo de microalgas, los procedimientos a seguir son básicamente los mismos, cambiando solamente parámetros relacionados con el recipiente donde se almacenan las microalgas y los nutrientes que se le suministran (temperatura, cantidad de luz, CO₂, pH, etc.).

Además, se puede concluir que las microalgas pueden ser producida efectivamente usando fertilizantes comerciales y que dichos fertilizantes tienen el potencial para reemplazar a los costosos medios nutritivos usados comúnmente en laboratorios alrededor del mundo para la producción de *Chlorella* spp.

Es interesante destacar que un factor no muy estudiado es la longitud de onda y el color de la luz entregada a las microalgas y que si tiene resultados estadísticamente significativos. Para futuros estudios se recomienda el uso de diodos emisores de luz RGB, similares a las luces utilizadas en peceras.

Finalmente, se puede concluir que para todas las microalgas el procedimiento de cultivo es muy parecido, pero los parámetros varían dependiendo de las necesidades biológicas de cada tipo, lo que implica que para cada cultivo de microalgas es necesario realizar un procedimiento de optimización en su producción.

3.5.Efectos de distintos factores de cultivo para el crecimiento de algas estudiado por distintos autores

- Moheimani [56] en su análisis de los efectos en la reducción del pH del medio, producto de la introducción de CO₂, concluye que puede inhibir el crecimiento de algas.
- Chiu [41] muestra un incremento en la producción de biomasa y acumulación de lípidos al incrementar la concentración de CO₂ en la aireación en los cultivos de *Nannochloropsis Oculata*.
- Kaewpintong [68] muestra un mejor crecimiento para un biorreactor de columna vertical tipo Airlift que uno que no tenga esta columna de aireación. Esto se explica ya que una buena aireación lleva a una mejor mezcla en el cultivo de microalgas, esto previene la sedimentación, mantiene condiciones homogéneas y ayuda en un mejor contacto entre células y nutrientes.
- Illman [49] descubrió que la reducción de nitrógeno del medio incrementaba el contenido de lípidos en las cinco cepas de *Chlorella* investigadas, entre las cuales *C. Emersonii*, *C. Minutissima* y *C. Vulgaris* aumentaron su contenido de lípidos en un 63%, 56% y 40% de biomasa por peso seco respectivamente.
- Macedo and Alegre [71] demostraron que el contenido de lípidos en *Spirulina* aumentaban por tres con la disminución de nitrógeno y de temperatura, siendo más efectivo en la disminución del nitrógeno.

4. Metodología

En este capítulo se detallan las actividades realizadas para alcanzar los objetivos previamente definidos y así poder obtener resultados significativos.

Primero se definieron los factores variables, los constantes y los no controlables para este estudio. Se determinó cual sería el rango de experimentación para dichos factores, cuál es la variable de respuesta a medir, la temperatura adecuada de secado, los procedimientos para iniciar un cultivo, la toma de muestras y se detallan los equipos utilizados en el Laboratorio de Termodinámica de la Universidad Técnica Federico Santa María.

Mediante el método experimental y con los datos obtenidos en el laboratorio, se realizó un análisis estadístico y se estableció la región de máxima eficiencia en la que se recomienda utilizar el equipo para este tipo de microalga.

En un primer estudio se decidió que el tiempo óptimo de cultivo sería de 3 días y se define una línea base para la curva de crecimiento del cultivo incluyendo su grafica. Luego se hace un experimento de cribado 2^3 en dos bloques, con el cual se pudo concluir que los factores más importantes en el cultivo de esta microalga fueron la cantidad de luz y de aire, además los efectos del difusor y la disposición en bloques fueron despreciables, por lo tanto, se pudo descartar el uso de difusor y el segundo bloque se pudo considerar como una réplica del ensayo. Siguiendo la Ruta del máximo ascenso, se amplía la zona de experimentación cercano al punto donde se obtuvo una mayor producción, con el método de superficie de respuesta 3^2 , en dos bloques y tres niveles de experimentación para cada factor, pero reduciendo la cantidad de fertilizante a la mitad. La disminución de fertilizante redujo la cantidad de masa microalgal producida, sin embargo, se encontró el mismo punto máximo.

Finalmente, se vuelve a medir en los puntos encontrados para la ruta de máximo ascenso, pero utilizando la cantidad original de fertilizante y verificando el punto de máxima eficiencia, obteniendo la cantidad de masa microalgal mayor de todos los ensayos.

4.1. Diseño experimental

El diseño del experimento tiene como principal finalidad la determinación del punto de máxima eficiencia en la producción de biomasa microalgal, con el fin de obtener la mayor cantidad de microalgas por cultivo en un fotobiorreactor. Según lo anterior, para realizar tal estudio se debe determinar los factores variables y los factores constantes, tal como se muestra en la Tabla 4.1.

4.1.1. Factores Variables

Los factores variables fueron el objeto de esta investigación, siendo estos: el nivel de iluminación (la cantidad de luces encendidas), la cantidad de litros por minuto del flujo de aire y el tipo de difusor (si se utiliza o no).

4.1.2. Factores Constantes

Dentro de los factores constantes se encuentran el tipo y la cantidad de nutrientes suministrados al cultivo, el volumen y la altura del cultivo. Adicionalmente, los factores que no fueron controlados son la temperatura ambiente del laboratorio y la presencia de otros microorganismos.

Tabla 4.1 Factores Constantes, Variables y No Controlables del experimento.

Factores Constantes	Fotoperiodo de cultivo Nutrientes suministrados Volumen y altura del cultivo
Factores Variables	Nivel de iluminación Tipo de difusor Flujo de aire
Factores No Controlables	Temperatura ambiental Presencia de otros microorganismos en el cultivo

4.1.3. Rango de experimentación

El rango de experimentación para cada factor escogido es el mostrado en la siguiente tabla:

Tabla 4.2 Niveles de experimentación.

Factor		Niveles de experimentación	Niveles intermedios
A	Nivel de Iluminación	2 – 5 luces	4 luces
B	Flujo de aire	1 – 4 mangueras	3 mangueras
C	Difusor	Sin - Con difusor	-

Se consideraba como cuarto factor un fotoperiodo entre 12 y 18 horas, sin embargo, el tiempo disponible de experimentación para el estudio era reducido y además tomando en consideración los planteamientos de Oscar Pupo [3], quien concluye que el fotoperiodo de un cultivo no es estadísticamente significativo al cambiar de 24 horas al día de luz a 18, no se experimentó con este factor. Por lo tanto, los factores que se tomaron en cuenta fueron la iluminación, el flujo de aire y el difusor.

4.1.4. Variable de respuesta

La variable que se medirá durante los 3 días que dura cada experimento es la cantidad de masa microalgal recolectada del cultivo. Realizando las mediciones todos los días a la misma hora. Para la medición de la cantidad de masa microalgal, se debe tomar una muestra

representativa de cada cultivo, el cual se deja secar en un horno a 60[°C] durante 20 horas, la elección de la temperatura de secado se explica a continuación.

4.1.5. Temperatura de secado de algas recomendado

La temperatura de secado durante la extracción de lípidos afecta tanto a la composición de estos, como a la “cosecha” de lípidos de la biomasa del alga [109]. Por ejemplo, realizar un secado a 60[°C] todavía retiene una alta concentración de TAG (triacylglycerol, triglicérido, triacilglicerol o triacilglicérido) en los lípidos y solo sufre una ligera disminución en su rendimiento (lipid yield), aumentar la temperatura disminuye tanto la concentración de TAG como su rendimiento [109].

4.2.Procedimiento

En los diferentes estudios que se han hecho sobre cultivo de microalgas, los procedimientos a seguir son básicamente los mismos, cambiando solamente parámetros relacionados con el recipiente donde se almacenan las microalgas y los nutrientes que se le suministran (temperatura, cantidad de luz, CO₂, pH, etc.). El procedimiento general es el siguiente:

Se tiene un recipiente (generalmente de vidrio o plástico) que se llena con agua y con una muestra de la microalga a estudiar. Posteriormente, se introducen los nutrientes necesarios y se conecta un mecanismo para introducir aire (limpio o aire para limpiar de gases contaminantes), con el fin de añadir el CO₂ necesario para el desarrollo del cultivo. Adicionalmente, se necesita incorporar un sistema para iluminar el recipiente (con luz solar o artificial), en este experimento se considera que el cultivo necesita un ciclo de luz y sombra de 12 horas cada uno, esta decisión se toma teniendo en consideración los planteamientos de

Oscar Pupo [3], quien concluye que el fotoperíodo de un cultivo no es estadísticamente significativo al cambiar de 24 a 18 horas de luz al día, y que en los trabajos de Martha Ortiz-Moreno [2] y Cherlys Infante [1] se toma un fotoperíodo de 12 horas al día. Sumado a lo anterior, se cree que es más conveniente trabajar con un fotoperíodo de 12 horas de luz al día y no 18 por ahorro de energía. Finalmente, es necesario asegurarse que el cultivo se mantenga dentro de un rango de temperatura específico para cada microalga, que por lo general la temperatura óptima varía entre los 25[°C] y 35[°C].

4.2.1. Inicio de cultivo

- En primer lugar, es necesario desinfectar con alcohol al 70% la superficie en donde se va a trabajar, el recipiente por dentro y por fuera que va a contener la mezcla entre algas, agua y nutrientes (NPK), la pipeta con la cual se tomará las muestras y todos los instrumentos que tengan contacto con la microalga o el recipiente [112].
- Se toman 2 muestras de 20 [ml] al recipiente que contiene el concentrado de microalga-agua a dividir, con el fin de tener un registro de los miligramos iniciales contenidos en el cultivo.
- Posterior a esto, se agrega un volumen de 2 litros el concentrado de microalga-agua dentro del nuevo recipiente (desinfectado), y se le agrega agua hasta completar los 5 litros.
- Se toman 2 muestras de 20 [ml] de dicho recipiente.
- Se agrega fertilizante, en este caso es 1 [ml] de fertilizante para todo el cultivo. El fertilizante es un complejo de NPK utilizado previamente en el cultivo de este tipo de microalga por la empresa Cokaru, la que ha permitido su uso tanto de las algas como del fertilizante para el presente estudio.

- Se agita la mezcla de microalga, agua y fertilizante.
- Se introduce una o más mangueras para suministrar aire mediante una bomba, y posteriormente se conecta para hacerla funcionar. Esta bomba es la encargada de entregar el CO₂ del aire necesario para el cultivo, además de generar turbulencia dentro de la mezcla.
- Se colocan las lámparas dispuestas a iluminar el recipiente y se conectan. Las lámparas están conectadas a un Timer, el cual define las horas del día en que las lámparas van a estar prendidas (12 horas de luz y 12 de sombra para este experimento).
- Finalmente, se deja que el cultivo tenga un crecimiento durante 3 días.

Durante todos los días se realizan análisis de muestras para llevar un registro de la cantidad de masa de microalgas existentes en el fotobiorreactor. Para extraer por completo la humedad de las muestras, inmediatamente después de dejar secar (durante 20 horas) en un horno a 60[°C], se sacan las placas Petri aun calientes y se depositan en un desecador, hasta llegar a la temperatura ambiente y posteriormente ser pesadas.

4.2.2. Toma de muestras de cultivo

El procedimiento es muy similar al anterior.

- En primer lugar, es necesario desinfectar con alcohol al 70% la mesa en donde se va a trabajar, la parte exterior del recipiente que contiene a las microalgas, la pipeta que toma las muestras y todos los instrumentos que tengan contacto con la microalga o el recipiente [112].
- Se toman 2 muestras de 20 [ml] al recipiente con la ayuda de la pipeta y propipeta, posteriormente se deposita su contenido en 2 placas Petri.

- Las 2 muestras se depositan dentro de un horno, el cual se fija a una temperatura de 60 [°C], y se deja funcionando por 20 horas. Posteriormente se depositan las muestras en un desecador hasta que se extrae toda la humedad de ellas, llegando a la temperatura ambiente.
- Luego del secado de las microalgas se procede a pesar las muestras.

4.3. Equipos principales

En una botella de agua mineral de 6 litros de capacidad, se inicia un cultivo de *Chlorella* spp al introducir en el recipiente 2 litros un concentrado de agua con microalgas, y que además se le agregan 3 litros de agua potable. Posteriormente se le introduce uno o más tubos, con o sin difusor, conectados a una bomba de aire, que es la encargada de suministrar el CO₂ necesario por la microalga, además de generar turbulencia dentro del cultivo. Finalmente se coloca el número de lámparas requeridas en cada caso conectadas a un Timer, el que se encarga de prender y apagar las lámparas según se requiera.



Figura 4.1 Cultivo de microalgas.



Figura 4.2 Difusor de aire.



Figura 4.3 Lámpara



Figura 4.4 Bomba de aire.

Tabla 4.3 Especificaciones Bomba de aire

Modelo	Voltaje	Power [W]	l/min	Mpa
E-JET268	220-240V/50Hz	3,0	2,7x2	0,015



Figura 4.5 Timer.



Figura 4.6 Propipeta.



Figura 4.7 Pipeta de 20 [ml].

Cada cultivo de microalgas se estudiará por un tiempo de tres días. En cada uno de estos días se harán mediciones del peso de las microalgas que se tiene en 20 [ml] de cultivo.

Para poder pesar las microalgas se toman 2 muestras de 20 [ml] de cultivo con pipeta y propipeta, las que se depositan en placas Petri y se dejan secar en un horno a 60[°C] por 20[h], para quitar toda la humedad se dejan reposar en un desecador.



Figura 4.8 Horno.



Figura 4.9 Desecador.

Finalmente, las placas Petri con microalgas secas se colocan en una balanza.

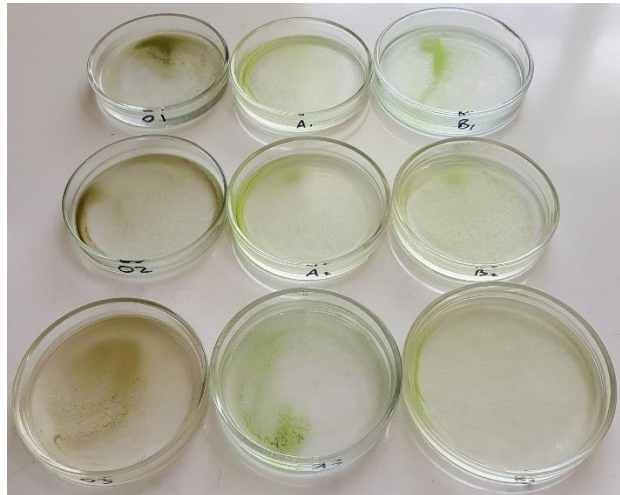


Figura 4.10 Capsulas Petri con diferentes muestras de microalgas secas.

Tabla 4.4 Especificaciones Balanza.

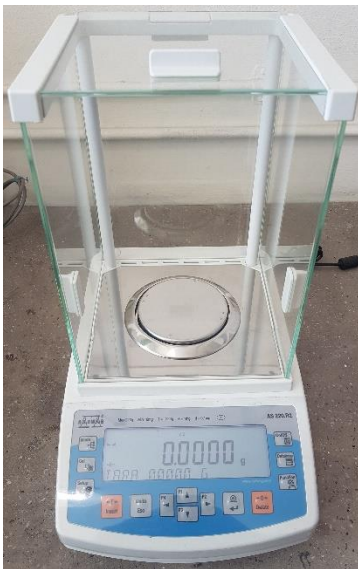


Figura 4.11 Balanza sin muestra.

Marca	RADWAG
Modelo	AS220.R2
Rango	0,01[g] – 220 [g]
Tara	-220[g]
Resolución	0,1 [mg]



Figura 4.12 Sistemas de fotobiorreactores por bloque.

Durante el presente estudio se va a trabajar con 2, 3, 4 y 5 lámparas por cada fotobiorreactor, las cuales se disponen geométricamente como se muestra con las Figuras 4.13 y 4.14.

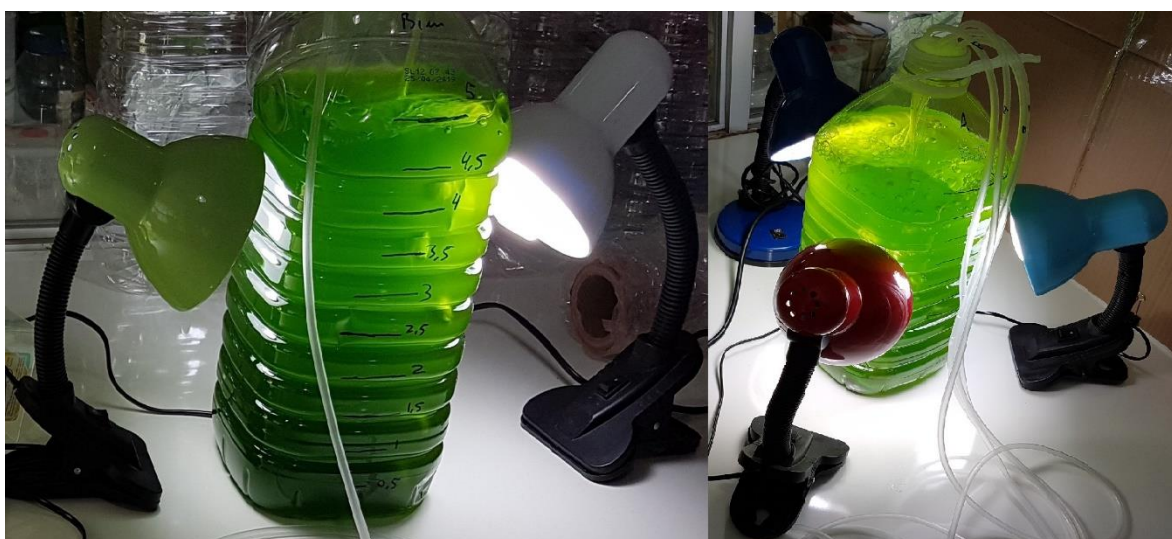


Figura 4.13 Fotobiorreactores con 2 y 3 lámparas respectivamente.



Figura 4.14 Fotobiorreactores con 4 y 5 lámparas respectivamente.

4.4. Maximización de la extracción

4.4.1. Metodología de Superficie de Respuesta

En el presente trabajo se utilizará la metodología de superficies de respuesta, la cual es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para el modelado y análisis de problemas en los que una respuesta de interés es influenciada por distintas variables y en donde se busca optimizar esta respuesta [12].

Se tiene que para una “respuesta de interés” que se quiera maximizar “ y ”, la que se ve influenciada por los parámetros x_1, x_2, \dots, x_n , tiene una función de la forma:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) + \epsilon \quad (1)$$

Donde ϵ representa el ruido o error observado en la respuesta y . La respuesta esperada se define como $E(y) = f(x_1, x_2, \dots, x_n) = \eta$, y a la superficie representada por:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (2)$$

se le llama superficie de respuesta.

Generalmente la superficie de respuesta se representa gráficamente como en la Figura 4.15, donde η se grafica proyectado en el plano x_1, x_2 .

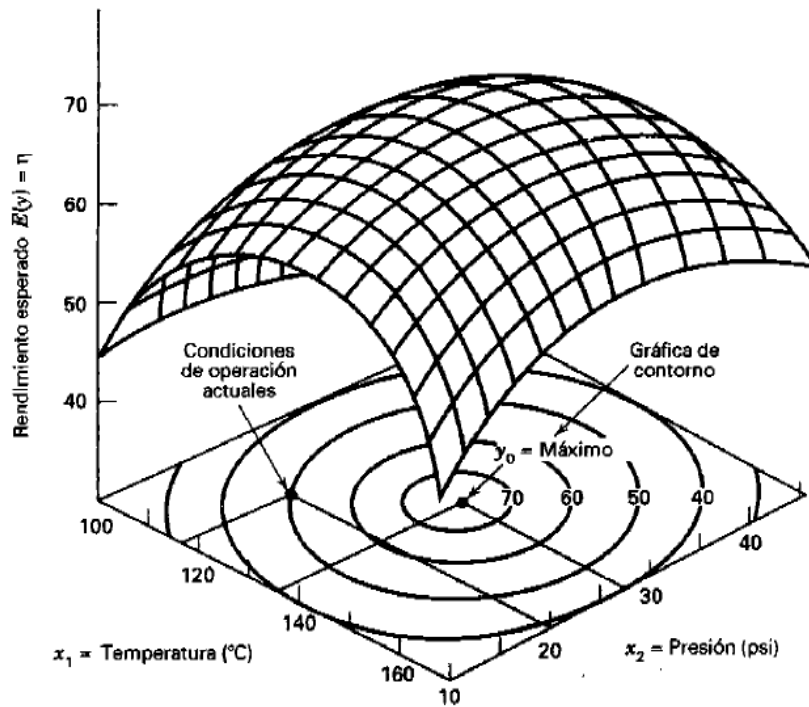


Figura 4.15 Gráfica de la superficie de respuesta para $E(y)=f(x_1, x_2, \dots, x_n)=\eta$. Adaptado de [12].

En la figura anterior se puede apreciar una respuesta máxima cercana al centro de la superficie, además, cada circunferencia proyectada sobre el plano x_1, x_2 corresponde a una altura en específico de la superficie de respuesta.

Se necesita encontrar la relación entre los factores que afectan a la variable de respuesta, para localizarla se siguen los siguientes pasos:

4.4.2. Acercamiento de primer orden

En esta fase se busca establecer un primer acercamiento a la relación entre los factores, mediante una función de la forma:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \epsilon \quad (3)$$

Esta relación se obtiene mediante un análisis de varianza o ANOVA de un diseño factorial en un sector cercano al punto de estimación inicial.

Al incorporar puntos centrales es posible estimar la magnitud del error, además de obtener la curvatura del sistema en dicho dominio. Si se observa una curvatura, es necesario modificar el diseño experimental. En el caso de que no existiese curvatura, entonces se puede decir que la aproximación lineal es suficientemente buena.

4.4.3. Método del máximo ascenso

Luego de obtener una primera aproximación, se sigue por el camino de máxima pendiente de la superficie de respuesta mediante una serie de mediciones, hasta que no se aprecie un aumento en la variable de respuesta, con esto se define un nuevo dominio.

4.4.4. Segunda aproximación lineal

Posteriormente a la determinación del nuevo dominio de experimentación, se vuelve a realizar una aproximación lineal mediante un diseño experimental. En el caso de encontrarse una curvatura, se expande el diseño obteniendo finalmente una superficie de respuesta de la forma:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \quad (4)$$

En donde se encuentra el máximo.

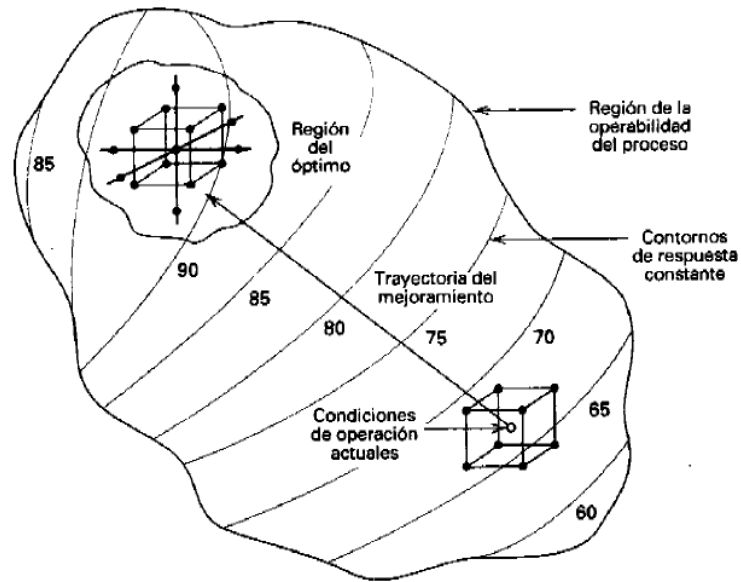


Figura 4.16 Representación gráfica del Método de Superficie de Respuesta. Adaptado de [12].

5. Resultados y análisis

5.1. Resultados preliminares

A continuación, se muestran los resultados del primer experimento, donde se tomó un tiempo de crecimiento del cultivo de 2 semanas, una iluminación de 2 lámparas y el flujo de aire entregado por una manguera (cada manguera tiene un flujo de aire de 2,7[l/min]) para cada fotobiorreactor y sin considerar el uso de un difusor, además de un fotoperiodo de 12 horas de luz y de oscuridad regulado por un Timer conectado a las lámparas. Este experimento muestra los valores en [mg] de las muestras de los fotobiorreactores A y B en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Crecimiento de masa microalgal en 2 semanas para los Fotobiorreactores A y B.

Día	A [mg]	B [mg]
1	16,6	17,4
2	20,0	24,2
3	31,9	31,2
4	32,5	30,9
5	31,7	32,8
6	32,5	32,7
7	33,2	32,5
8	34,0	32,4
9	32,6	32,3
10	34,1	33,0
11	34,2	33,8

Los datos de los días 6 y 7 son interpolaciones ya que en esos días no se pudo ingresar al laboratorio.

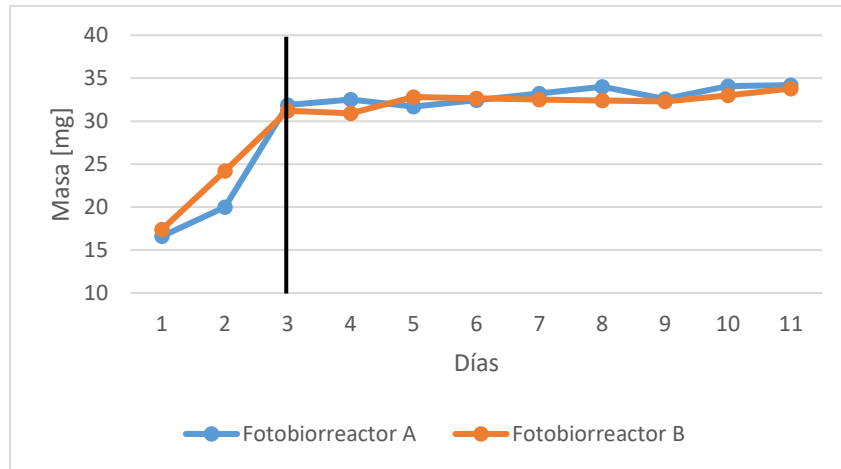


Figura 5.1 Crecimiento de masa microalgal en 2 semanas para los Fotobiorreactores A y B.

Con base a lo anterior, se determinó que el tiempo prudente para realizar los experimentos es de 3 días para la toma de muestras, ya que es en ese momento cuando el crecimiento tiene un aumento más significativo, tal como se muestra en la Figura 5.1. Además, se utilizaron 10[ml] de fertilizante por la cantidad de días. Y el tamaño de muestra fue de 20[ml] de agua-algas en cada placa Petri.

5.2.Línea Base

Esta línea se elige tomando como base un trabajo realizado en paralelo llamado “Uso de material microalgal para depurar gases contaminantes” de Ignacio Hernández, cuyo objetivo es distinto al del presente estudio, pero se utilizan las mismas algas y fertilizante. Para 4 fotobiorreactores se utilizaron 4 módulos de luces led y 2 lámparas, además una bomba de aire con dos salidas de 140[l/h], que es aproximadamente 2,3[l/min], un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, 5[ml] de fertilizante y un tiempo de cultivo de 2 semanas. Los parámetros utilizados en iluminación, flujo de aire, fotoperiodo y cantidad de fertilizante por esta persona son muy parecidos a los que yo utilicé, ya que por cada fotobiorreactor se utilizaron 2 lámparas y un flujo de aire de 2,7 [l/min], que es el flujo que entrega cada

manguera, un fotoperiodo de 12 horas de luz y oscuridad y 1[ml] de fertilizante para un tiempo de cultivo de 3 días. Para definir la línea base del estudio se tomó como referencia los siguientes tres ensayos, en donde se trabajó con una iluminación de 2 lámparas, un flujo de aire de 1 manguera y sin considerar el uso de un difusor para cada fotobiorreactor. Además, se utilizó 1[ml] de fertilizante y se determinó un tiempo de cultivo de 3 días. En la Tabla 5.2 y en la Figura 5.2 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5.2 Crecimiento de densidad microalgal en 3 días de cultivo de la Línea Base.

Ensayos	Densidad [g/l] día 1	Densidad [g/l] día 2	Densidad [g/l] día 3
1	0,6567	0,7341	0,7400
2	0,4767	0,6370	0,6667
3	0,5800	0,7250	0,7500
Promedio	0,5711	0,6987	0,7189

Cabe mencionar que la densidad para este ensayo se define como los [mg] de masa de microalga seca dividido por los 20 [ml] de muestra que se toma de cada fotobiorreactor.

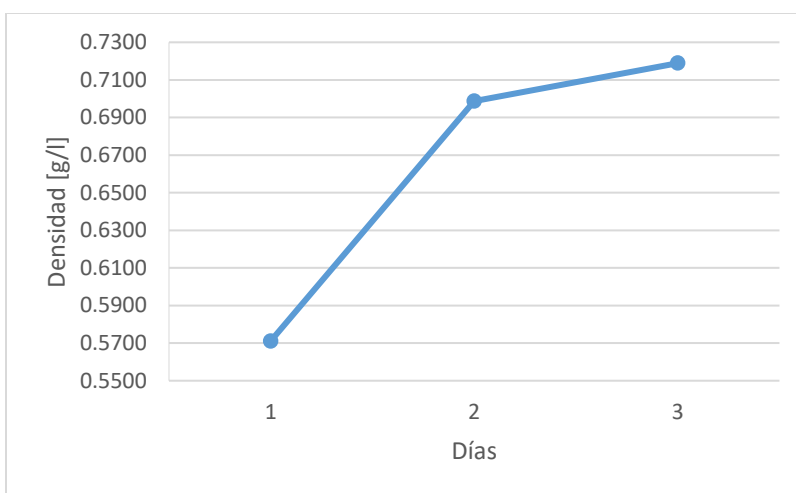


Figura 5.2 Promedio del crecimiento de densidad microalgal en 3 días de cultivo para los ensayos del 1 al 3.

5.3. Selección del Diseño Experimental

Decidiéndose por un tiempo óptimo de cultivo de 3 días, se procede al primer diseño experimental cribado 2^3 . En este diseño se tienen dos niveles para tres factores de experimentación, además se realiza en dos bloques, por lo tanto, se hace necesario realizar 16 corridas de experimentos ($2^3 \times 2 = 16$ experimentos). En este estudio se utiliza una cantidad de fertilizante de 1[ml] por cultivo, adicionalmente cada manguera contribuye con 2,7[l/min] de flujo de aire. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.3.

5.4. Primer diseño experimental

Tabla 5.3 Primer diseño experimental.

Corrida	Bloque	Iluminación [N° de lámparas]	Flujo de aire [N° de mangueras]	Difusor	Densidad [g/l]
1	1	4	3	1	0,8400
2	1	2	1	1	0,5925
3	1	4	3	2	0,8225
4	1	2	1	2	0,7125
5	1	2	3	2	0,7500
6	1	4	1	2	0,6750
7	1	2	3	1	0,7500
8	1	4	1	1	0,8375
9	2	4	3	1	0,8425
10	2	2	1	1	0,5775
11	2	4	3	2	0,8150
12	2	2	1	2	0,6150
13	2	2	3	2	0,7525
14	2	4	1	2	0,7550
15	2	2	3	1	0,7475
16	2	4	1	1	0,7350

Tabla 5.4 Tabla ANOVA para densidad de masa microalgal.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Lámparas	0,0425391	1	0,0425391	17,98	0,0014
B: Mangueras	0,042025	1	0,042025	17,76	0,0014
C: Difusor	0,0000390625	1	0,0000390625	0,02	0,9001
bloques	0,001225	1	0,001225	0,52	0,4868
Error total	0,0260219	11	0,00236563		
Total (corr.)	0,11185	15			

R-cuadrada = 76,735 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 68,275 porciento

Error estándar del est. = 0,0486377

Error absoluto medio = 0,0301562

Estadístico Durbin-Watson = 2,48619 (P=0,6869)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,303681

El valor p es un indicador que se asocia con la hipótesis nula, en este caso, estima la probabilidad de que un efecto en cuestión presente un valor cero, lo que implica que dicha interacción no está presente en el modelo de forma significativa. De esta forma, los valores por debajo de 0,05 indican que dicho parámetro es estadísticamente significativo para el valor impuesto, ya que muestra que la probabilidad de que dicha variable no sea significativa para el modelo no es mayor a un 5%.

De acuerdo con la Tabla 5.4 se puede determinar que los factores estadísticamente significativos son la cantidad de luz y de aire, además los efectos del difusor y los que se tienen por bloques son despreciables, por lo tanto, el segundo bloque puede considerarse como replica.

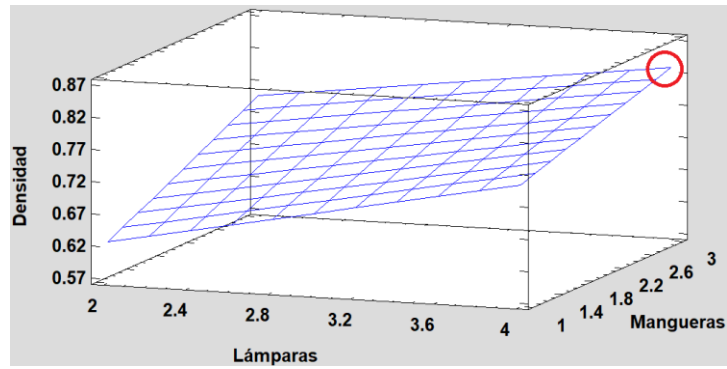


Figura 5.3 Superficie de Respuesta.

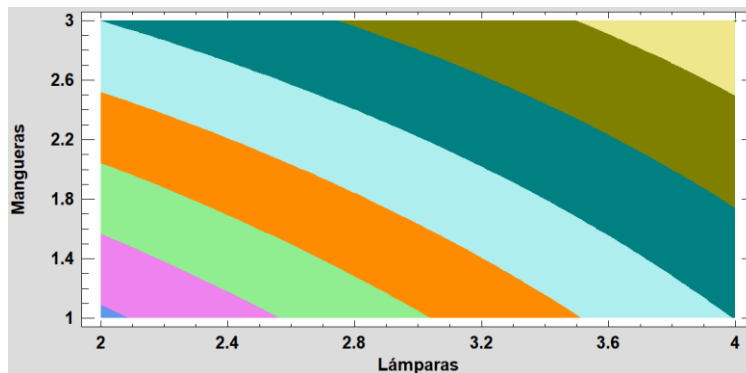


Figura 5.4 Contornos de la Superficie de Respuesta.

En la Figura 5.3 se puede observar una leve tendencia a un máximo para los niveles más altos de los parámetros estudiados, es decir, para 3 mangueras y 4 lámparas señalado con un círculo rojo. Para corroborar esta afirmación, se procede a ampliar para: 3, 4 y 5 lámparas y para 2, 3 y 4 mangueras.

De la Figura 5.4 no se puede apreciar con claridad alguna curvatura que pueda corroborar la existencia de un máximo.

Tabla 5.5 Estadísticas de la regresión.

Coefficiente de correlación múltiple	0,869711
Coefficiente de determinación R ²	0,756398
R ² ajustado	0,695498
Error típico	0,047651
Observaciones	16

Tabla 5.6 Tabla ANOVA del modelo para densidad de masa microalgal.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	3	0,084603	0,028201	12,4202317	0,000545011
Residuos	12	0,027247	0,002271		
Total	15	0,11185			

Tabla 5.7 Análisis de coeficientes de regresión del modelo.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0,48625	0,057131	8,511144	1,9733E-06	0,361772294	0,610727706
A: Lámparas	0,051563	0,011913	4,328388	0,00098149	0,025607104	0,077517896
B: Mangueras	0,05125	0,011913	4,302156	0,00102797	0,025294604	0,077205396
C: Difusor	-0,00313	0,023825	-0,13116	0,89781947	-0,0550.5792	0,018785792

Las Tablas 5.6 y 5.7 confirman que el modelo es estadísticamente significativo junto con los parámetros de la Luz, y del Aire. Con el análisis anterior se pudo determinar que los factores más importantes son la cantidad de lámparas y mangueras. Por lo tanto, se puede descartar el tipo de difusor, considerando también que en los estudios de Oscar Pupo el tipo de difusor no resulta estadísticamente significativo [3]. Obteniendo finalmente se tiene un valor óptimo de 0,8425[g/l] con 4 lámparas, 3 mangueras y sin difusor.

El modelo de regresión es de la forma

$$Y = \beta_0 + \beta_1 * X_1 + \beta_2 * X_2 \quad (5)$$

Donde β_0 corresponde al valor del Coeficiente de la “Intercepción” de la Tabla 5.7, β_1 al coeficiente de “A: Lámparas” y β_2 al coeficiente de “B: Mangueras”.

Para obtener la ruta de máximo ascenso presentada en la Tabla 5.8, se procedió a realizar los siguientes cálculos:

Con los datos obtenidos con la Tabla 5.7, la ecuación (5) se puede reescribir de la siguiente forma

$$Y = 0,48625 + 0,05156 * X_1 + 0,05125 * X_2 \quad (6)$$

Se calcula la dirección del máximo ascenso

$$\nabla Y = \begin{bmatrix} \partial Y / \partial X_1 \\ \partial Y / \partial X_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,05156 \\ 0,05125 \end{bmatrix} \quad (7)$$

Se tiene la siguiente relación entre las variables codificadas y las naturales

$$X_n = \frac{\alpha_n - (\alpha_{high} + \alpha_{low})/2}{(\alpha_{high} - \alpha_{low})/2} \quad (8)$$

Las variables codificadas X_1 y X_2 al despejarlas, se obtiene

$$X_1 = \frac{\alpha_1 - (\alpha_{high} + \alpha_{low})/2}{(\alpha_{high} - \alpha_{low})/2} = \frac{\alpha_1 - (4 + 2)/2}{(4 - 2)/2}$$

$$X_1 = \alpha - 3 \quad (9)$$

$$X_2 = \frac{\alpha_2 - (\alpha_{high} + \alpha_{low})/2}{(\alpha_{high} - \alpha_{low})/2} = \frac{\alpha_2 - (3 + 1)/2}{(3 - 1)/2}$$

$$X_2 = \alpha - 2 \quad (10)$$

La relación entre β_1 y β_2 es

$$\frac{\beta_1}{\beta_2} = \frac{0,05156}{0,05125} \approx 1,0061 \quad (11)$$

La variable natural con el mayor efecto es $\Delta\alpha_1$, ya que β_1 es mayor que β_2 . Además, se definió que la variación de α_1 fuera de 1 ya que intuitivamente se pensó que un mayor incremento en la iluminación no sería significativo. Por lo anterior, se establece que

$$\Delta\alpha_1 = 1 \quad (12)$$

Al evaluar las variables codificadas en el origen, se tiene

$$X_1 = X_2 = 0$$

Reemplazando en (9) y (10) se consiguen los valores en el origen para las variables naturales

$$\alpha_1 = 3, \quad \alpha_2 = 2 \quad (13)$$

Encontrando una relación para ΔX_1 y $\Delta\alpha_1$

$$(X_1 + \Delta X_1) - X_1 = \alpha_1 + \Delta\alpha_1 - 3 - (\alpha_1 - 3)$$

$$\Delta X_1 = \alpha_1 + \Delta\alpha_1 - 3 - \alpha_1 + 3$$

Por lo tanto,

$$\Delta X_1 = \Delta\alpha_1 = 1 \quad (14)$$

Se tiene la relación

$$\Delta X_i = \frac{\beta_i}{\beta_j} \Delta X_j \quad (15)$$

Despejando

$$\Delta X_1 = \frac{\beta_1}{\beta_2} \Delta X_2 \quad (16)$$

Reemplazando con los valores obtenidos en (11) y (14)

$$1 = \frac{0,05156}{0,05125} \Delta X_2$$

Finalmente,

$$\Delta X_2 = 0,9939 = \Delta \alpha_2 \quad (17)$$

Por lo tanto, cuando la cantidad de lámparas aumenta en 1, la cantidad de mangueras lo hace en 0,9939.

De los resultados anteriores se construye la Tabla 5.8 para la ruta del máximo ascenso:

Tabla 5.8 Ruta de máximo ascenso.

Corrida	Paso	Variable Natural	
		Lámparas	Mangueras
	Delta	1	0,9939
1	Origen	3	2,0000
2	Origen + 1*delta	4	2,9939
3	Origen + 2*delta	5	3,9878

A continuación, se hace un diseño buscando el punto óptimo, para esto se amplía la zona de experimentación cercano al punto donde se obtuvo la mayor densidad microalgal y que contiene también los puntos determinados en la ruta del máximo ascenso de la forma siguiente:

Tabla 5.9 Niveles de experimentación del segundo diseño.

Factor		Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel intermedio
A	Nivel de Iluminación [lámparas]	3	5	4
B	Flujo de aire [mangueras]	2	4	3

El método es de superficie de respuesta con 1 repetición ($3^2 \times 2 = 18$ experimentos). Adicionalmente a esto se cambia la cantidad de fertilizante de 1[ml] a 0,5[ml] ya que no se logró conseguir más, sumado a recomendación del fabricante de dicho fertilizante.

5.5.Segundo diseño experimental

Para el siguiente diseño se descarta el factor difusor, se consideran tres niveles para dos factores de experimentación. En este caso se utiliza el método de superficie de respuesta ya que es un método más completo que cribado, en dos bloques, utilizando 0,5[ml] de fertilizante. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10 Segundo diseño experimental.

Corrida	Bloque	Iluminación [N° de lámparas]	Flujo de aire [N° de mangueras]	Densidad [g/l]
1	1	3	2	0,7000
2	1	5	3	0,7000
3	1	4	2	0,7625
4	1	5	2	0,6125
5	1	5	4	0,7525
6	1	4	3	0,8375
7	1	3	4	0,7350
8	1	4	4	0,7675
9	1	3	3	0,7250
10	2	3	2	0,7250
11	2	5	3	0,7250
12	2	4	2	0,7275
13	2	5	2	0,7175
14	2	5	4	0,7350
15	2	4	3	0,7350
16	2	3	4	0,6525
17	2	4	4	0,8100
18	2	3	3	0,7175

Tabla 5.11 Tabla ANOVA para densidad de masa microalgal.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Lámparas	0,0000130208	1	0,0000130208	0,01	0,9276
B: Mangueras	0,00358802	1	0,00358802	2,38	0,1513
AA	0,0170085	1	0,0170085	11,28	0,0064
AB	0,00475312	1	0,00475312	3,15	0,1035
BB	0,000925174	1	0,000925174	0,61	0,4501
bloques	0,000125347	1	0,000125347	0,08	0,7785
Error total	0,0165927	11	0,00150843		
Total (corr.)	0,0430059	17			

R-cuadrada = 61,4176 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 40,3727 porciento

Error estándar del est. = 0,0388385

Error absoluto medio = 0,0243827

Estadístico Durbin-Watson = 2,11079 (P=0,3804)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,0598152

De acuerdo con la Tabla 5.11 el único factor estadísticamente significativos es la interacción de AA, y se pueden despreciar los efectos que se tienen por bloques.

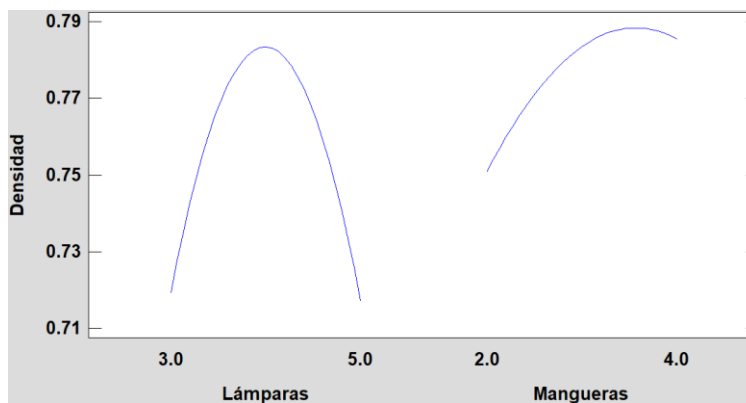


Figura 5.5 Efectos principales.

En la Figura 5.5 se puede observar claramente la curvatura propia del máximo en ambos factores, para 4 lámparas y 3 mangueras.

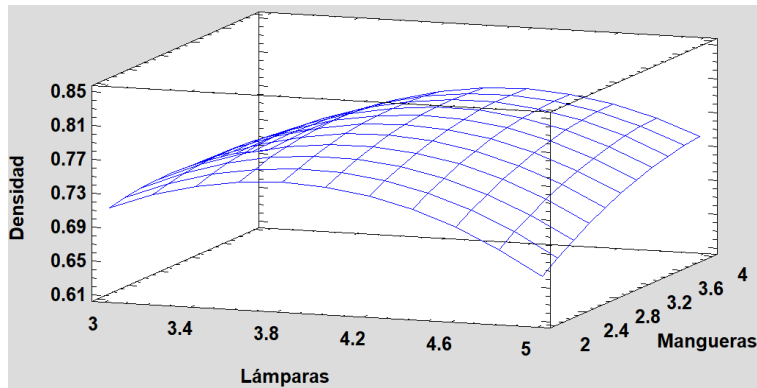


Figura 5.6 Superficie de Respuesta.

En la Figura 5.6 se ve claramente una curvatura y el punto máximo para los parámetros antes mencionados.

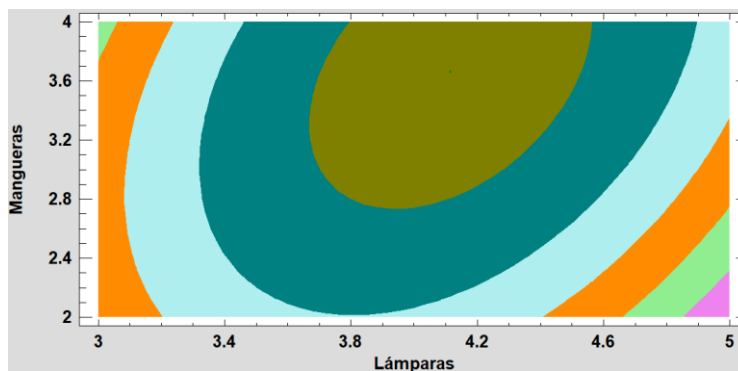


Figura 5.7 Contornos de la Superficie de Respuesta.

En la Figura 5.7 se aprecia que la región de eficiencia máxima se encuentra para valores cercanos a los encontrados, es decir, para 4 lámparas y 3 mangueras.

La comparación de los distintos posibles modelos a utilizar se detalla en Anexo I. El modelo escogido se detalla a continuación:

El modelo de regresión escogido es el que incluye los efectos de A, de B y donde se tiene que el valor de β_0 es igual a cero ya que facilita el cálculo del gradiente al tener solo los efectos de los factores de primer orden.

Tabla 5.12 Estadísticas de la regresión.

Coefficiente de correlación múltiple	0,98657019
Coefficiente de determinación R ²	0,97332073
R ² ajustado	0,90915328
Error típico	0,12672876
Observaciones	18

Tabla 5.13 Tabla ANOVA del modelo para densidad de masa microalgal.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	2	9,37459338	4,68729669	291,8583	9,8067E-13
Residuos	16	0,25696287	0,01606018		
Total	18	9,63155625			

Tabla 5.14 Análisis de coeficientes de regresión del modelo.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	0	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D	#N/D
A: Lámparas	0,10526786	0,02245113	4,68875534	0,00024646	0,05767359	0,15286213
B: Mangueras	0,09702381	0,02947978	3,29119874	0,00460387	0,03452947	0,15951815

Las Tablas 5.13 y 5.14 muestran que los factores estadísticamente significativos son la cantidad de luz y del aire, junto con el modelo.

El modelo de regresión resultante es:

$$Y = 0,10527 * X_1 + 0,09702 * X_2 \quad (18)$$

Con los datos obtenidos se completa la Tabla 5.15 para la ruta del máximo ascenso:

Tabla 5.15 Ruta de máximo ascenso del segundo experimento.

Corrida	Paso	Variable Natural		Densidad [g/l]
		Lámparas	Mangueras	
	Delta	1	0,9939	
1	Origen	3	2,0000	0,7125
2	Origen + 1*delta	4	2,9939	0,7863
3	Origen + 2*delta	5	3,9878	0,7438

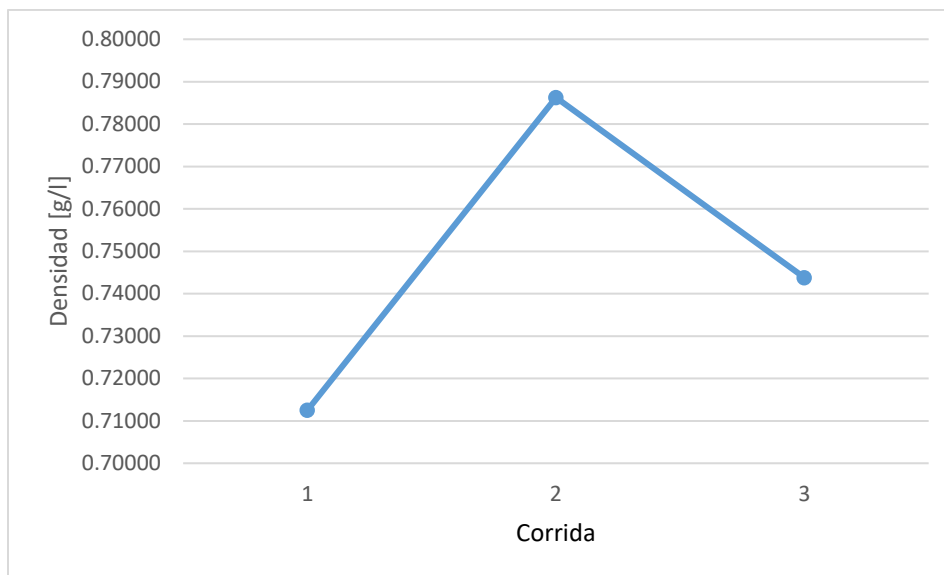


Figura 5.8 Ruta de máximo ascenso del segundo experimento.

En la Figura 5.8 se puede apreciar que en el punto para 4 lámparas y 3 mangueras de flujo de aire se llega a un punto máximo.

Con el análisis anterior se tiene un valor de óptimo de 0,8375[g/l] para 4 lámparas y 3 mangueras, valor menor al obtenido anteriormente. Con lo anterior se concluye que la cantidad de fertilizante efectivamente influye en la producción de material microalgal. Si bien no se obtuvieron los resultados esperados, si se corrobora que es el mismo punto máximo anterior al trabajar con 4 lámparas y 3 mangueras. Además de lo anterior, se concluye que al realizar los ensayos como dos bloques simultáneos no se producen efectos que puedan alterar los resultados obtenidos, por lo tanto, el segundo bloque también puede considerarse como réplica.

Debido a lo antes expuesto se puede concluir que se está trabajando en un punto cercano al máximo, sin embargo, el haber reducido la cantidad de fertilizante utilizado afectó la densidad de microalgas producidas, por lo que se volvió a realizar el experimento anterior midiendo los datos para los puntos encontrados en la ruta de máximo ascenso, con la cantidad

de fertilizante utilizada originalmente, que es de 1[ml]. El objetivo de esta etapa es verificar que el punto encontrado es, efectivamente, el punto de máxima eficiencia en la producción de biomasa microalgal. Los datos obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 5.16 Ruta de maximo ascenso con 1[ml] de fertilizante.

Corrida	Iluminación [lámparas]	Flujo de aire [mangueras]	Densidad [g/l]
1	3	2	0,8125
2	4	3	0,8950
3	5	4	0,8275

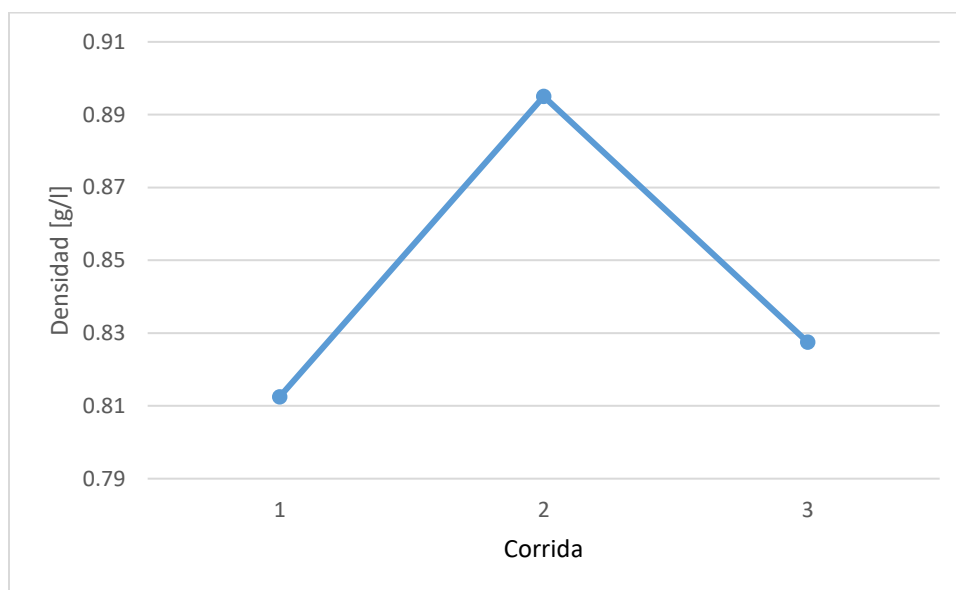


Figura 5.9 Ruta de máximo ascenso con 1[ml] de fertilizante.

En la Figura 5.9 se puede apreciar que en el punto para 4 lámparas y 3 mangueras de flujo de aire se llega a un punto máximo.

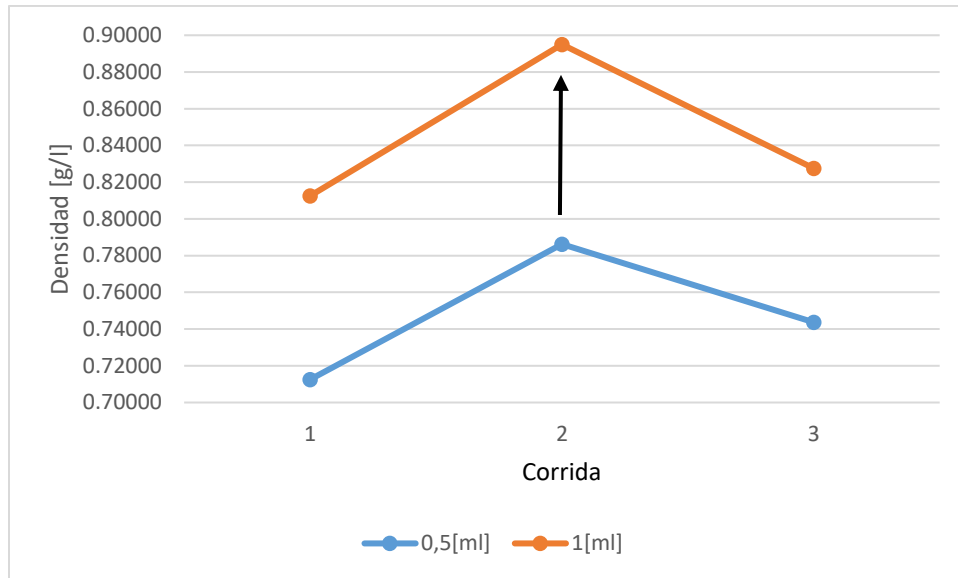


Figura 5.10 Comparación de Ruta de máximo ascenso para 0,5[ml] y 1[ml] de fertilizante.

En la Figura 5.10 se puede observar que el aumentar de 0,5[ml] a 1[ml] de fertilizante se da un salto en la cantidad de material microalgal obtenido, logrando una mejora de todos los puntos a un nivel superior.

Con el análisis anterior se tiene un valor de óptimo de 0,8950[g/l] de microalgas secas para 4 lámparas y 3 mangueras, siendo este el mayor valor obtenido de todas las experiencias. Con lo anterior se concluye que la cantidad de fertilizante efectivamente influye en la producción de material microalgal y se podría considerar como un tercer factor a estudiar. Con esto se obtiene el mismo punto de máxima eficiencia para todas las experiencias, y se puede determinar que se está, efectivamente, en el punto de operación óptima.

Haciendo una comparación entre la línea base y el punto óptimo se tiene lo siguiente.

Tabla 5.17 Comparación de la Línea Base con el Punto Óptimo.

Línea base	Optimo	Incremento
0,7400	0,8950	1,2095
0,6667	0,8950	1,3424
0,7500	0,8950	1,1933
Promedio		
0,7189	0,8950	1,2450

Con la información mostrada en la Tabla 5.17 se puede observar que se parte de un valor de 0,7189[g/l] al utilizar 2 lámparas y 1 manguera de aire, y después de la optimización se obtuvo 0,8950[g/l] al utilizar 4 lámparas y 3 mangueras, por lo tanto, hubo un incremento del 24,50% con respecto a la línea base.

6. Conclusiones

- Se logró determinar una línea base para la curva de crecimiento de cultivo de microalgas, tomando como base un trabajo realizado en paralelo por Ignacio Hernández, en donde se utilizan parámetros similares, además de usar las mismas algas y fertilizante.
- Se determinó que los factores más importantes, posteriormente al análisis del experimento, fueron la cantidad de luz, de aire y de fertilizante suministradas al cultivo.
- El experimento permitió determinar que el punto de máxima eficiencia se encontró con 4 lámparas y 3 mangueras de aire, obteniendo un óptimo de 0,8950[g/l] de microalgas secas.
- El uso de difusor no fue un factor estadísticamente significativo, contrario a lo que se pensó inicialmente, que al utilizar burbujas de aire más pequeñas aumentaría la producción de microalgas. Esto se puede explicar ya que los difusores se van tapando con el uso, haciendo que las bombas entreguen un menor flujo de aire en comparación con las mismas sin el difusor.
- Se puede concluir que para todas las microalgas el procedimiento de cultivo es muy parecido, pero los parámetros varían dependiendo de las necesidades biológicas de cada tipo, lo que implica que para cada cultivo de microalgas es necesario realizar un procedimiento de optimización en su producción.
- Haciendo una comparación entre los ensayos de la línea base y el resultado del diseño experimental final, se puede apreciar un claro aumento en la densidad celular de las muestras, llegando a un tener un incremento en un 24,50%.

- Cabe destacar la importancia de la limpieza y esterilidad del lugar de trabajo, ya que, por la falta de ésta en los primeros ensayos, hubo retrasos en el proceso de experimentación debido a condiciones externas relacionadas a este factor.
- Finalmente, se establece un diseño con el que se alcanza una zona optima de operación, con los recursos disponibles, para el tipo de microalga estudiada en un fotobiorreactor.

7. Recomendaciones

- Para futuros estudios, sería interesante tener un control de temperatura y pH, variar la cantidad de nutrientes, adicionar CO₂. Además, se recomienda introducir los fotobiorreactores en una estructura completamente cerrada para evitar que entren contaminantes externos, si es posible fabricada de madera o algún material sólido.
- Un factor que se podría agregar al estudio es la longitud de onda y el color de la luz entregada a las microalgas. Para futuros estudios se recomienda el uso de diodos emisores de luz RGB, similares a las luces utilizadas en peceras.
- El tipo de fertilizante es un factor que se mantuvo constante. Para estudios posteriores se recomienda aumentar la cantidad del fertilizante utilizado y probar con otros para determinar las diferencias que produce en el crecimiento del cultivo.
- Para los fotobiorreactores utilizados en el presente estudio, se utilizaron como contenedor botellas de 6[l] de agua mineral. Para futuros estudios se recomienda utilizar otro tipo de receptáculo que sean de un mayor tamaño y que permitan una limpieza más fácil.
- En este estudio se utilizó agua potable. Para estudios posteriores se podría evaluar el uso de agua mineral, aunque esto podría significar mayores costos.

8. Referencias

- [1] Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular por Cherlys Infante... [et al]. Revista Avances en Ciencias e Ingeniería. 3(2):159-164, abril-junio, 2012.
- [2] Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas por Martha L. Ortiz- Moreno... [et al.]. Revista de la Universidad de los Llanos – Villavicencio, Meta Colombia 16(1) diciembre 2011.
- [3] OSCAR Rafael Pupo Roncallo. Diseño de un fotobiorreactor para optimizar la producción de microalgas. Tesis (Magíster en Ingeniería Mecánica). Barranquilla, Colombia. Fundación Universidad el Norte, Departamento de Ingeniería Mecánica, 2012. 106 h.
- [4] HERNÁNDEZ-PEREZ, Alexis y LABBÉ, José I. Microalgas, cultivo y beneficios en revista de biología marina y oceanografía. 49(2):157-173, agosto 2014.
- [5] Modeling the competition between antenna size mutant and wild type microalgae in outdoor mass culture por Tim de Mooij... [et al.]. Revista de Elsevier Journal of Biotechnology 240(2016): 1-13, octubre 2016.
- [6] LÓPEZ-SIERRA, Facundo, MORAÑA, Liliana B y SALUSSO, María M. Aislamiento, identificación y cultivo de *Chlorella vulgaris* con potencial para suplemento nutricional de peces en revista de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Salta. Mayo 2015.
- [7]. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación por Angélica Evelin Delgadillo-López... [et al.]. Revista de Tropical and Subtropical Agroecosystems de la

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,
Centro de Investigaciones Químicas, 14(2011): 597-612, enero 2011.

[8] DATTA, Subhendu, MUNILKUMAR, Sukham y MAHAPATRA, Bijay K. Culture of *Chlorella* spp through Replacement of Expensive Pure Nutritive Media with Low Cost Commercial Fertilizers en revista *Environment & Ecology*. 1430-1434, octubre-diciembre, 2016.

[9] CAMACHO, R y CAMPOS, V. Cultivo y elaboración de un producto comestible de *Chlorella vulgaris*. 15-17. México DF: Universidad Autónoma de México. Marzo 2009.

[10] SÁEZ Catalán, Sebastián. Desarrollo de un procedimiento optimizado para la extracción de bioaceite a partir de biomasa microalgal. Tesis (Ing, Civil Mecánica). Valparaíso. UTFSM, Departamento de Ingeniería Mecánica, 2019. 92 h.

[11] SANHUEZA, Sebastián. Optimización de rendimientos de extracción soxhlet de bioaceite a partir de biomasa macroalgal marina. Tesis (Ing, Civil Mecánica). Valparaíso. UTFSM, Departamento de Ingeniería Mecánica, 2019. 134 h.

[12] DOUGLAS, C. Montgomery. Diseño y análisis de experimentos. 2^a. ed. New York Chichester, Brisbane Singapore Toronto and Weinheim. Editorial Lumusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. 2004. 686p

[13] ZHANG, Xing. Microalgae removal of CO₂ from flue gas en *Revista de IEA Clean Coal Centre*, London, United Kingdom. Abril 2015

[14] *Microalgae Mass Production Methods* por Ying Shen... [et al.]. *Revista American Society of Agricultural and Biological Engineers* ISSN 0001-2351. 52(4): 1275-1287, julio 2009.

- [15] Biomass Ccumulation of Chlorella Zofingiensis G1 Cultures Grown Outdoors in Photobiorreactors. School of Food and Biological Engeneering por Shuhao Huo... [et al.]. revista *Frontiers in Energy Research*. 6(49), junio 2018.
- [16] Tecnología de Cultivo de Microalgas en Fotobiorreactores por Roberto Benavente-Valdés... [et al.]. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, México*. Enero 2012.
- [17] RAMÍREZ, Luis G., ZEPKA, Leila Q. y JACOB-LOPES, Eduardo. Fotobiorreactor: Herramienta para cultivo de cianobacterias. *Revista de Universidad de Carabobo (UC), Venezuela*. 6(2): 9-19, junio 2013.
- [18] MATA, Teresa M., MARTINS, António A. y CAETANO, Nidia S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Review* 14 (2010) 217-232, julio 2009.
- [19] BRENNAN, Liam y OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Review* 14 (2010) 557-577, octubre 2009.
- [20] Crecimiento Poblacional y Productividad de la Microalga Nativa Chlorella peruviana bajo Diferentes Salinidades por Mauro Mariano Astocondor... [et al.]. *Revista de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú*. 976-986, Julio 2017
- [21] Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae por C. -H. Ra... [et al.]. *Bioresource Technology* 212 (2016) 254-261, [dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.059](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.059).

- [22] Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans* por Li Y... [et al.]. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008;81(4):629–36.
- [23] Biofuels from microalgae por Li Y... [et al.]. *Biotechnology Progress* 2008;24(4):815–20.
- [24] *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* por Richmond A. Blackwell Science Ltd; 2004.
- [25] A look back at the U.S. Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae por Sheehan J... [et al.]. NREL/TP-580-24190, National Renewable Energy Laboratory, USA; 1998.
- [26] Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae por Aslan S, Kapdan IK. *Ecological Engineering* 2006;28(1): 64–70.
- [27] The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture por Renaud SM, Thinh LV, Parry DL. *Aquaculture* 1999; 170: 147–59.
- [28] CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 2007;25(3): 294–306.
- [29] Biodiesel fuel production from algae as renewable energy por Hossain ABMS... [et al.]. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2008;4(3):250–4.
- [30] Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances por Hu Q... [et al.]. *The Plant Journal* 2008; 54:621–39.

- [31] Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor por Rodolfi L... [et al.]. *Biotechnology and Bioengineering* 2009;102(1):100–12.
- [32] A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution por Rosenberg JN... [et al.]. *Current Opinion in Biotechnology* 2008;19(5):430–6.
- [33] Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production por Schenk PM... [et al.]. *Bioenergy Research* 2008; 1: 20–43.
- [34] Tsukahara K, Sawayama S. Liquid fuel production using microalgae. *Journal of the Japan Petroleum Institute* 2005;48(5):251–9.
- [35] Delucchi MA A. Lifecycle Emissions Model (LEM): lifecycle emissions from transportation fuels; motor vehicles, transportation modes, electricity use, heating and cooking fuels. Main report UCD-ITS-RR-03-17; 2003.
- [36] CO₂ bio-mitigation using microalgae por Wang B... [et al.]. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008;79(5):707–18.
- [37] Directive 2003/30/EC on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport; mayo 2003.
- [38] A perspective on the biotechnological potential of microalgae por Raja R... [et al.]. *Critical Reviews in Microbiology* 2008;34(2):77–88.
- [39] Commercial applications of microalgae por Spolaore P... [et al.]. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2006;101(2): 87–96.
- [40] Barclay B. Microalgae Culture Collection 1984–1985. Microalgal Technology Research Group (MTRG). SERI/SP-231-2486; 1984.

- [41] Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration por Chiu SY... [et al]. *Bioresource Technology* 2009; 100: 833–8.
- [42] De Morais MG, Costa JAV. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnology Letters* 2007;29(9):1349–52.
- [43] Demirbas A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management* 2009; 50: 14–34.
- [44] Eriksen NT. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters* 2008; 30: 1525–36.
- [45] Feinberg DA. Fuel options from microalgae with representative chemical compositions. *SERI/TR-231-2427*; 1984.
- [46] Gouveia L, Oliveira AC. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2009; 36: 269–74.
- [47] Scale-up of tubular photobioreactors por Grima EM... [et al.]. *Journal of Applied Phycology* 2000;12: 355–68.
- [48] Huntley ME, Redalje DG. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 2007;12(4):573–608.
- [49] Illman AM, Scragg AH, Shales SW. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 2000; 27:631–5.
- [50] Systems analysis and futuristic designs of advanced biofuel factory, concepts por Leathers J... [et al.]. *SANDIA Report, SAND2007-6872*; 2007.
- [51] Lee YK. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology* 2001; 13:307–15.

- [52] Sancho MEM, Castillo MJ, El Yousfi F. Photoautotrophic consumption of phosphorus by *Scenedesmus obliquus* in a continuous culture. Influence of light intensity. *Process Biochemistry* 1999;34(8):811–8.
- [53] Miao X, Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 2006;97(6):841–6.
- [54] Michiki H. Biological CO₂ fixation and utilization project. *Energy Conversion and Management* 1995;36(6–9):701–5.
- [55] Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction por Minowa R... [et al.]. *Fuel* 1995;74(12):1735–8.
- [56] Moheimani NR. The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation. Tesis (PhD). Murdoch University; 2005.
- [57] Moheimani NR, Borowitzka MA. The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. *Journal of Applied Phycology* 2006;18:703–12.
- [58] Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value por Natrah F... [et al.]. *Journal of Applied Phycology* 2007; 19: 711–8.
- [59] Growth of microalgae in high CO₂ gas and effects of SOX and NOX por Negro M... [et al.]. *Applied Biochemistry and Biotechnology – Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* 1991;28–29:877–86.
- [60] Pyrolytic characteristics of microalgae as renewable energy source determined by thermogravimetric analysis por Peng W... [et al.]. *Bioresource Technology* 2001; 80: 1–7.
- [61] Benefits and current developments of polyunsaturated fatty acids from microalgae lipids por Poisson L... [et al.]. *OCL – Oleagineux Corps Gras Lipides* 2002;9(2-3):92–5.

- [62] Sawayama S, Minowa T y Yokoyama SY. Possibility of renewable energy production and CO₂ mitigation by thermochemical liquefaction of microalgae. *Biomass and Bioenergy* 1999;17(1):33–9.
- [63] Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor por Scragg AH... [et al.]. *Biomass and Bioenergy* 2002;23(1):67–73.
- [64] Teixeira CM y Morales ME. Microalga como materia prima para producción de biodiesel. *Revista: Biodiesel o Novo combustivel do Brasil*; 2007. pp. 91–6.
- [65] Thomas WH, Tornabene TG, Weissman J. Screening for lipid yielding microalgae: activities for 1983. *SERI/STR-231-2207*; 1984.
- [66] Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology* 2008;99(10):4021–8.
- [67] Zhu CJ, Lee YK. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology* 1997; 9:189–94.
- [68] KAEWPINTONG K. Cultivation of *Haematococcus pluvialis* in Airlift Bioreactor. Tesis (Máster en Ingeniería Química). Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University; 2004.
- [69] Chojnacka K, Marquez-Rocha FJ, Kinetic. Stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology* 2004;3(1):21–34.
- [70] Barbosa MJGV. Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation. PhD thesis. Wageningen University, The Netherlands; 2003.
- [71] Macedo RVT, Alegre RM. Influencia do Teor de Nitrogenio no Cultivo de *Spirulina Maxima* em Dois Niveis de Temperatura – Parte II. *Producao de Lipídios Cienc Tecnol Aliment Campinas* 2001;21(2):183–6.

- [72] Borowitzka MA. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 1999;70(1–3):313–21.
- [73] Chen F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Tibtech* 1996; 14: 421–6.
- [74] Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007; 74:1163–74.
- [75] Supercritical fluid extraction of fatty acids and carotenoids from the microalgae *Spirulina maxima* por Canela APRF... [et al.]. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 2002;41(12): 3012–8.
- [76] Piccolo T. Aquatic biofuels. *GlobeFish-FIIU*; May 2008, Available at: http://www.globefish.org/files/Aquaticbiofuels_638.pdf.
- [77] Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations—response surfacemethodology analysis por Bilanovic D... [et al.]. *Energy Conversion and Management* 2009;50(2): 262–7.
- [78] CO₂ bio-mitigation using microalgae por Wang B... [et al.]. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008;79(5):707–18.
- [79] CHISTI, Yusuf. Biodiesel frommicroalgae. *Biotechnology Advances* 2007;25(3):294–306.
- [80] Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor por Rodolfi L... [et al.]. *Biotechnology and Bioengineering* 2008;102(1):100–12.

- [81] Pulz O, Scheinbenbogan K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 1998; 59: 123–52.
- [82] Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology* 2008;99(10):4021–8.
- [83] Pulz O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001;57(3):287–93.
- [84] Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects por Janssen M... [et al.]. *Biotechnology and Bioengineering* 2003;81(2):193–210.
- [85] Borowitzka M. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology* 1997;9(5):393–401.
- [86] Borowitzka MA. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 1999;70(1–3):313–21.
- [87] Borowitzka M. Algal biotechnology products and processes—matching science and economics. *Journal of Applied Phycology* 1992;4(3):267–79.
- [88] The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in southern Spain por Jiménez C... [et al.]. *Aquaculture* 2003;217(1–4):179–90.
- [89] Terry KL, Raymond LP. System design for the autotrophic production of microalgae. *Enzyme and Microbial Technology* 1985;7(10):474–87.
- [90] CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology* 2008;26(3):126–31.

- [91] Lee YK. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology* 2001;13(4):307–15.
- [92] Setlik I, Veladimir S, Malek I. Dual purpose open circulation units for large scale culture of algae in temperate zones. I. Basic design considerations and scheme of a pilot plant. *Algologie Studies (Trebon)* 1970;1(11).
- [93] Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress* 2006;22(6):1490–506.
- [94] Tubular photobioreactor design for algal cultures Molina Grima E... [et al.]. *Journal of Biotechnology* 2001;92(2):113–31.
- [95] Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae por Sánchez Mirón A... [et al.]. *Journal of Biotechnology* 1999;70(1–3):249–70.
- [96] Ugwu CU, Ogbonna J, Tanaka H. Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002;58(5):600–7.
- [97] Watanabe Y, Saiki H. Development of a photobioreactor incorporating *Chlorella* sp. for removal of CO₂ in stack gas. *Energy Conversion and Management* 1997;38(Suppl. 1): S499–503.
- [98] P. S. Schulze, H. G. Pereira, T. F. Santos. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (leds) on growth and biochemical profiles of *nannochloropsis oculata* and *tetraselmis chuii*, *Algal Research* 16 (2016) 387 – 398, [dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.034](https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.034)
- [99] Richmond A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. *Journal of Applied Phycology* 2000;12(3–5):441–51.

- [100] Suh IS, Lee SB. A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 2003; 82:180–9.
- [101] Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture por Sánchez Mirón A... [et al.]. *Enzyme and Microbial Technology* 2002;31(7):1015–23.
- [102] Huntley M, Redalje D. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 2007;12(4):573–608.
- [103] Chen F, Zhang Y, Guo S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnology Letters* 1996;18(5):603–8.
- [104] Eriksen N. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008;80(1):1–14.
- [105] Chen G-Q, Chen F. Growing phototrophic cells without light. *Biotechnology Letters* 2006;28(9):607–16.
- [106] Graham LE, Graham JM, Wilcox LW. *Algae*, 2nd ed., San Francisco: Pearson Education, Inc.; 2009.
- [107] Zhang XW, Zhang YM, Chen F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry* 1999;34(5): 477–81.
- [108] Andrade MR, Costa JAV. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture* 2007;264(1–4): 130–4.

- [109] Widjaja A, Chien C-C, Ju Y-H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2009;40(1):13–20.
- [110] Carbon dioxide sequestering using microalgae systems Stepan DJ... [et al.]. Pittsburgh, PA: U.S. Department of Energy; 2002.
- [111] An overview of biodiesel and petroleum diesel life cycles por Sheehan J... [et al.]. National Renewable Energy Laboratory (NREL) and US Department of Energy (USDOE); 1998.
- [112] SCOTT, Elizabeth. How a 70 Percent Alcohol can Disinfect Better Than a 91 Percent [en línea] <<https://www.checklistboards.com/article.cfm?ArticleNumber=171>> [consulta: 20 septiembre 2020]
- [113] LEWIN, Ralph A. (1962). *Physiology and Biochemistry of algae*. Academic Press. 929 páginas.
- [114] Faria A. C. E. A., C. Hayashi, C. Soares and W. M. Furuya. Dinamica da comunidade fitoplanctonica e variáveis físicas e químicas em tanques experimentais submetidos a diferentes adubações orgánicas. *Acta Sci. Biol Sci*, 23: 291-297. 2001.
- [115] Lee, H., S. Lee y B. Park. The estimation of algal yield parameters associated with mixotrophic and photoheterotrophic growth under batch cultivation. *Biomass*, 18(2), 153-160. 1989.
- [116] In-field experimental verification of cultivation of microalgae *Chlorella* sp. using the flue gas from a cogeneration unit as a source of carbon dioxide por Kastanek, F.S... [et al.]. *Waste Management & Research*: 28(11), 961-966. 2010.

[117] Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* por Bashan, L... [et al.]. *Water Research*: 36, 2941-2948. 2002.

[118] Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor por Chiu, S... [et al.]. *Bioresource Technology*: 99, 3389-3396. 2008.

[119] Lee YK, Chen KW, Ma X. Growth of *Chlorella* outdoors in a changing light environment. *J Appl Phycol*: 9: 425-430. 1997.

[120] Improvement of microalgae biomass productivity and subsequent biogas yield of hydrothermal gasification via optimization of illumination por Daniel Fozer... [et al.]. *Revista Renewable Energy and International Journal* 2019.

Anexos

Anexo I: Distintos modelos de regresión para el Segundo diseño

En primer lugar, se detallan los 7 modelos considerados para este diseño, en los cuales varían los factores A, B, AA y si se incluye o no la constante de la regresión.

- Modelo que incluye los factores A, B, AA y β_0 igual a cero

Tabla 0.1 Estadísticas de la regresión.

Coefficiente de correlación múltiple	0,99875055
Coefficiente de determinación R ²	0,99750265
R ² ajustado	0,93050301
Error típico	0,04004443
Observaciones	18

Tabla 0.2 Coeficientes de regresión del modelo.

	Coeficientes
Intercepción	0
A: Luz	0,35894579
B: Aire	0,0159878
AA	-0,04521574

- Modelo que incluye los factores A, B, AA y β_0 distinto de cero

Tabla 0.3 Estadísticas de la regresión.

Coefficiente de correlación múltiple	0,69226154
Coefficiente de determinación R ²	0,47922604
R ² ajustado	0,36763162
Error típico	0,03999674
Observaciones	18

Tabla 0.4 Coeficientes de regresión del modelo.

	Coeficientes
Intercepción	-0,31770833
A: Luz	0,520625
B: Aire	0,01729167
AA	-0,06520833

- Modelo que incluye los factores AA y β_0 igual a cero

Tabla 0.5 Estadísticas de la regresión.

Coefficiente de correlación múltiple	0,9271154
Coefficiente de determinación R ²	0,85954297
R ² ajustado	0,80071944
Error típico	0,28209508
Observaciones	18

Tabla 0.6 Coeficientes de regresión del modelo.

	Coeficientes
Intercepción	0
AA	0,03787205

- Modelo que incluye los factores AA y β_0 distinto de cero

Tabla 0.7 Estadísticas de la regresión.

Coefficiente de correlación múltiple	0,06262301
Coefficiente de determinación R ²	0,00392164
R ² ajustado	-0,05833326
Error típico	0,0517429
Observaciones	18

Tabla 0.8 Coeficientes de regresión del modelo.

	Coeficientes
Intercepción	0,73765112
AA	-0,0004674

- Modelo que incluye los factores A, B y β_0 igual a cero

Tabla 0.9 Estadísticas de la regresión.

Coefficiente de correlación múltiple	0,98657019
Coefficiente de determinación R ²	0,97332073
R ² ajustado	0,90915328
Error típico	0,12672876
Observaciones	18

Tabla 0.10 Coeficientes de regresión del modelo.

	Coeficientes
Intercepción	0
A: Luz	0,10526786
B: Aire	0,09702381

- Modelo que incluye los factores A, B y β_0 distinto de cero

Tabla 0.11 Estadísticas de la regresión.

Coefficiente de correlación múltiple	0,28936769
Coefficiente de determinación R ²	0,08373366
R ² ajustado	-0,03843518
Error típico	0,05125418
Observaciones	18

Tabla 0.12 Coeficientes de regresión del modelo.

	Coeficientes
Intercepción	0,68215278
A: Luz	-0,00104167
B: Aire	0,01729167

- Modelo que incluye los factores A y AA y β_0 igual a cero

Tabla 0.13 Estadísticas de la regresión.

Coefficiente de correlación múltiple	0,99858911
Coefficiente de determinación R ²	0,99718022
R ² ajustado	0,93450398
Error típico	0,0411999
Observaciones	18

Tabla 0.14 Coeficientes de regresión del modelo.

	Coeficientes
Intercepción	0
A: Luz	0,38365824
AA	-0,04827158

Tabla 0.15 Comparación entre modelos.

Modelo	R ² ajustado	Error Típico
A+B+AA sin constante	0,930503005	0,04004443
A+B+AA con constante	0,367631624	0,03999674
AA sin constante	0,800719443	0,28209508
AA con constante	-0,058333256	0,0517429
A+B sin constante	0,909153278	0,12672876
A+B con constante	-0,038435185	0,05125418
A+AA sin constante	0,93450398	0,0411999

Las regresiones de los modelos que presentaron mayor R^2 ajustado son las siguientes:

- A+B+AA y β_0 igual a cero

$$Y = 0,35895 * A + 0,01599 * B - 0,04522 * A * A$$

- AA y β_0 igual a cero

$$Y = 0,03787 * A * A$$

- A+B y β_0 igual a cero

$$Y = 0,10527 * A + 0,09702 * B$$

Con los modelos de regresión anteriores, se completa la siguiente tabla:

Tabla 0.16 Datos medidos y predichos de densidad para distintos modelos.

Corrida	Bloque	Luz	AA	Aire	Densidad	A+B+AA	A+B	A+AA
1	1	3	9	2	0,7000	0,7019	0,5099	0,7165
2	1	5	25	3	0,7000	0,7123	0,8174	0,7115
3	1	4	16	2	0,7625	0,7443	0,6151	0,7623
4	1	5	25	2	0,6125	0,6963	0,7204	0,7115
5	1	5	25	4	0,7525	0,7283	0,9144	0,7115
6	1	4	16	3	0,8375	0,7603	0,7121	0,7623
7	1	3	9	4	0,7350	0,7338	0,7039	0,7165
8	1	4	16	4	0,7675	0,7763	0,8092	0,7623
9	1	3	9	3	0,7250	0,7179	0,6069	0,7165
10	2	3	9	2	0,7250	0,7019	0,5099	0,7165
11	2	5	25	3	0,7250	0,7123	0,8174	0,7115
12	2	4	16	2	0,7275	0,7443	0,6151	0,7623
13	2	5	25	2	0,7175	0,6963	0,7204	0,7115
14	2	5	25	4	0,7350	0,7283	0,9144	0,7115
15	2	4	16	3	0,7350	0,7603	0,7121	0,7623
16	2	3	9	4	0,6525	0,7338	0,7039	0,7165
17	2	4	16	4	0,8100	0,7763	0,8092	0,7623
18	2	3	9	3	0,7175	0,7179	0,6069	0,7165

En las siguientes tres figuras se puede apreciar la relación que se tiene entre los datos predichos y los datos medidos.

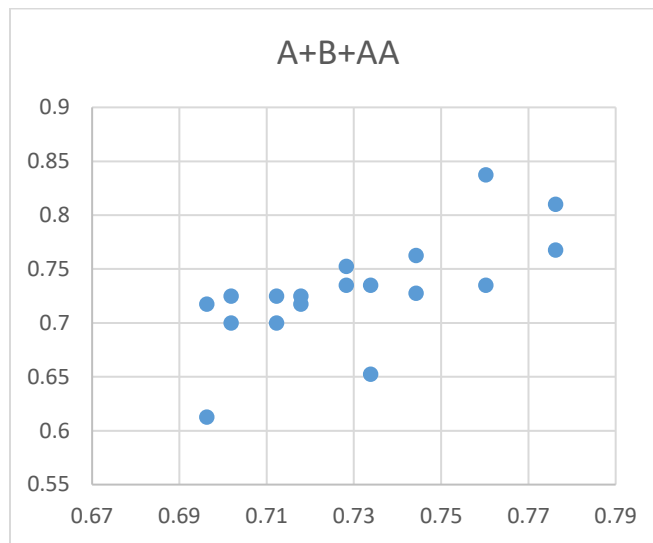


Figura 0.1 Grafica de datos predichos vs medición para modelo que incluye los factores A, B y AA.

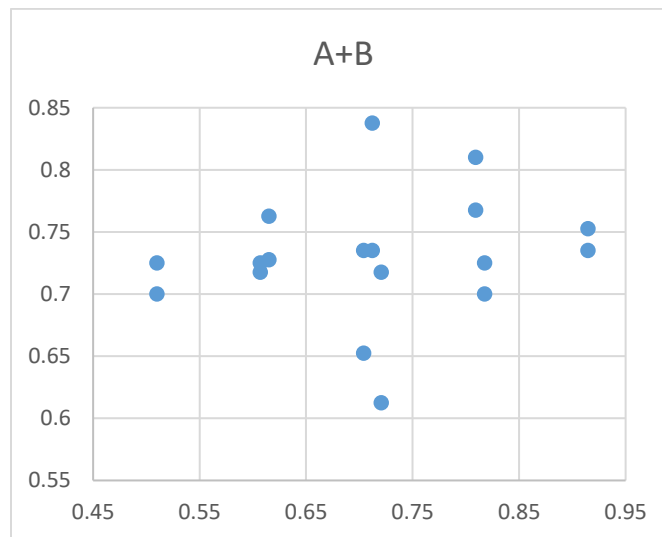


Figura 0.2 Grafica de datos predichos vs medición para modelo que incluye los factores A y B.

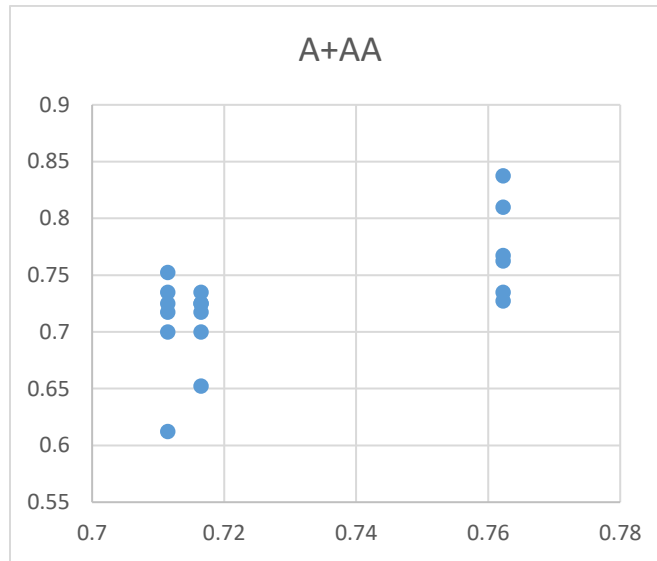


Figura 0.3 Grafica de datos predichos vs medición para modelo que incluye los factores A y AA.

En la tabla siguiente se muestran los modelos que presentaron mayor R^2 ajustado entre los 7 modelos inicialmente considerados

Tabla 0.17 Comparación entre modelos.

Modelo	R^2 ajustado
A+B+AA y β_0 igual a cero	0,93050
A+AA y β_0 igual a cero	0,93450
A+B y β_0 igual a cero	0,90915

A pesar de que en la tabla ANOVA se observa que el único factor significativo es el A, se escoge el modelo de regresión que incluye los efectos de A, de B y donde se tiene que β_0 es igual a cero ya que facilita el cálculo del gradiente al tener solo los efectos de los factores de primer orden. Si bien los valores de R^2 ajustado de los otros modelos son mayores, no son valores muy alejados al escogido (0,91 vs 0,93).