



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

“Alternativa para la intensificación a bajo costo en el cultivo de microalgas”

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Jorge Alberto Mora Pinargote

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2019



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

College of Maritime Engineering and Sea Science

"Low-cost alternative for the intensification of microalgae culture"

CAPSTONE COURSE

A project submitted in partial fulfillment of the requirements for the
degree of:

Aquaculture Engineer

By:

Jorge Alberto Mora Pinargote

GUAYAQUIL - ECUADOR

2019

DEDICATORIA

Dedicado a:

Mi padre y madre, quienes, con su imperecedero amor, esfuerzo y paciencia, me han permitido alcanzar esta meta.

Mi abuelo Vicente, mi inspiración para seguir adelante. Su amor incondicional y constante apoyo han hecho posible lograr este objetivo.

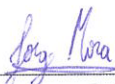
Mis demás familiares quienes me brindaron su cariño y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a ESPOL y CENAIM por las facilidades brindadas para llevar a cabo el presente proyecto.

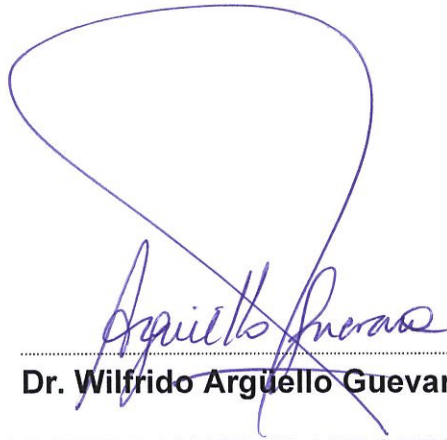
DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Jorge Alberto Mora Pinargote* doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



Jorge Alberto
Mora Pinargote

EVALUADOR

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Argüello Guevara', is written over a horizontal dotted line. A large, loopy flourish extends upwards from the signature.

Dr. Wilfrido Argüello Guevara

PROFESOR DE LA MATERIA / PROFESOR TUTOR

RESUMEN

En CENAIM, usando el método “Batch”, no es posible satisfacer la demanda de microalgas, en términos de calidad y cantidad, por parte de los diferentes laboratorios del centro. Las bajas densidades obtenidas, obligan a hacer uso de grandes volúmenes que ocupan un gran espacio físico, dificultan el manejo y el traslado de estos cultivos. Por otro lado, el CENAIM, adquirió un fotobiorreactor para solucionar dichos problemas, sin embargo, este sistema presenta un elevado costo económico. Por lo tanto, es necesario diseñar una alternativa adaptada al CENAIM, que permita la intensificación a bajo costo en el cultivo de microalgas, produciendo mayores concentraciones y mejor calidad de microalgas en el espacio físico disponible. Mediante una revisión bibliográfica, se identificaron alternativas para mejorar la densidad y calidad en el cultivo de microalgas. Como resultado, se propuso un proceso de cultivo “Batch”, integrando fotobiorreactores tubulares helicoidales diseñados a bajo costo. Además, se plantearon correcciones a problemas puntuales identificados en el protocolo tradicional. Así mismo, se estimaron las densidades de *Nannochloropsis sp.* producidas, en 9 m², por el fotobiorreactor diseñado (45.5×10^{12} cel), siendo mayores que el método “Batch” y similares al del fotobiorreactor del CENAIM. También, se calculó el costo operacional del fotobiorreactor diseñado (\$20.45), siendo similar al del fotobiorreactor del CENAIM. Sin embargo, el costo de implementación (\$4,458.10) fue un 85.5% menor. En conclusión, el proceso de cultivo planteado puede producir mayores densidades de microalgas de alta calidad en menor área, comparado con el método “Batch”, y, de menor costo que fotobiorreactores comerciales.

Palabras Clave: Cultivo de microalgas, intensificación, fotobiorreactor, bajo costo.

ABSTRACT

*In CENAIM, using the batch method, it's not possible to satisfy the quality and quantity demand for microalgae by the different laboratories of the center. The low densities produced by this method, make it necessary to use large volumes occupying a large physical space, hinder both the culture management and the transfer. On the other hand, CENAIM acquired a photobioreactor to solve these problems, however, this system has a high economic cost. Therefore, it is necessary to design an alternative adapted to CENAIM, which allows the intensification at low cost in the cultivation of microalgae, producing higher concentrations and better quality of microalgae in the available physical space. Through a literature review, alternatives were identified to improve density and quality in the cultivation of microalgae. As a result, a "Batch" cultivation process was proposed, integrating helical tubular photobioreactors designed at low cost. In addition, corrections were made to the main problems identified in the traditional protocol. Likewise, the densities of *Nannochloropsis* sp. produced, in 9 m², by the photobioreactor designed (45.5×10^{12} cel), being larger than the batch method and similar to the CENAIM's photobioreactor. Also, the operational cost of the designed photobioreactor (\$ 20.45) was calculated, being similar to the CENAIM's photobioreactor, however, the implementation cost (\$ 4,458.10) was 85.5% lower. In conclusion, the proposed cultivation process can produce higher densities of high-quality microalgae in a smaller area, compared with the "Batch" method, and, it is less expensive than commercial photobioreactors.*

Keywords: Microalgae culture, intensification, photobioreactor, low-cost.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ABREVIATURAS	v
SIMBOLOGÍA	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
CAPÍTULO 1.....	1
1. Introducción.....	1
1.1 Descripción del problema	1
1.2 Justificación del problema	1
1.3 Objetivos.....	2
1.3.1 Objetivo General	2
1.3.2 Objetivos Específicos.....	2
1.4 Marco teórico.....	2
1.4.1 Características de las microalgas	2
1.4.2 Aplicaciones e importancia de las microalgas en acuicultura	4
1.4.3 Especies de microalgas más utilizadas en acuicultura	6
1.4.4 Condiciones para el cultivo	7
1.4.5 Métodos de cultivo	10
1.4.6 Sistemas de cultivo	11
CAPÍTULO 2.....	14
2. Metodología.....	14
2.1 Cultivo de microalgas en CENAIM.	14
2.1.1 Método “Batch”.	14
2.1.2 Fotobiorreactor PBR100L®.....	23

2.2	Alternativas para la Intensificación del cultivo de microalgas en CENAIM.	24
2.2.1	Revisión e identificación de problemas en el protocolo de cultivo de microalgas en CENAIM	25
2.2.2	Análisis de fotobiorreactores para su implementación al cultivo de microalgas en CENAIM	26
2.2.3	Criterio de selección de la alternativa para la intensificación del cultivo. ...	29
CAPÍTULO 3.....		30
3.	Resultados Y ANÁLISIS	30
3.1	Mejora del protocolo de manejo en cultivo “Batch” del CENAIM	30
3.2	Planteamiento de un fotobiorreactor para la intensificación de los cultivos microalgas del CENAIM	30
3.3	Diseño de bajo costo de un FBR tubular helicoidal.	30
3.3.1	Fotocelda	30
3.3.2	Colector.....	32
3.3.3	Materiales y costo de implantación.	34
3.4	Funcionamiento del diseño de FBR propuesto.....	35
3.5	Adecuamiento de las áreas de cultivo de microalgas para la integración del FBR en CENAIM	36
3.6	Proceso planteado para el cultivo intensivo de microalgas en CENAIM	37
3.7	Productividad proyectada del cultivo intensivo de microalgas	38
3.8	Costo operacional de producción	39
CAPÍTULO 4.....		41
4.	Conclusiones Y Recomendaciones	41
4.1	Conclusiones	41
4.2	Recomendaciones.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....		43
APÉNDICES		48

ABREVIATURAS

CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FBR	Fotobiorreactor

SIMBOLOGÍA

CO ₂	Dióxido de carbono
K	Potasio
Mg	Magnesio
Na	Sodio
Ca	Calcio
SO ₄ ²⁻	Ion Sulfato
Cl	Cloro
HCO ₃	Bicarbonato
O ₂	Oxígeno gaseoso
°C	Grados Celsius
m	metro
cm	centímetro
mm	milímetro
pulg	pulgada
L	Litros
mL	Mililitros
g L ⁻¹ d ⁻¹	Gramos por litro día
cel	Células
cel/mL	Células por mililitro
ton	Tonelada
\$	Dólar americano

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1.1 Cadena trófica en un ecosistema marino (Lavens & Sorgeloos, 1996)	3
Ilustración 1.2 Curva de crecimiento de microalgas con sus 5 fases (Lavens & Sorgeloos, 1996)	4
Ilustración 1.3 Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura. (FAO, 2018)	5
Ilustración 1.4 Diagrama esquemático del efecto destello en microalgas como resultado del mezclado en un sistema de cultivo (Abu-Ghosh et al., 2016)	8
Ilustración 1.5 Sistemas de cultivo de microalgas. A la izquierda un raceway, a la derecha un estanque circular (Klinthong et al., 2015)	12
Ilustración 2.1 Esquema representativo de las áreas dispuestas para el cultivo de microalgas en CENAIM	15
Ilustración 2.2 Aumento de volúmenes de cultivo empleado en el CENAIM usando el método “Batch” (Reyes, 2018).....	23
Ilustración 2.3 Diseño y funcionamiento de un FRB vertical – “airlift” (Nitin Thukral, 2015)	27
Ilustración 2.4 Fotobiorreactor vertical – bolsas, fotografía tomada en “ExxonMobil’s greenhouse” ubicado en La Jolla, California.....	28
Ilustración 2.5 Fotobiorreactor tubular helicoidal (Briassoulis et al., 2010)	29
Ilustración 3.1 Diagrama esquemático de la fotocelda; Izquierda: vista frontal; Derecha: vista superior	31
Ilustración 3.2 Diagrama esquemático del colector	32
Ilustración 3.3 Diagrama esquemático del fotobiorreactor helicoidal de bajo costo.....	33
Ilustración 3.4 Modelo 3D del fotobiorreactor tubular helicoidal de bajo costo diseñado	34
Ilustración 3.5 Ubicación espacial de los fotobiorreactores en el laboratorio C1 y recipientes de cultivo para el método “Batch” en el laboratorio C2.....	37
Ilustración 3.6 Diagrama de los tanques exteriores adecuados según las recomendaciones planteadas.....	37
Ilustración 3.7 Proceso planteado para el cultivo intensivo de microalgas en CENAIM	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Cadena trófica en un ecosistema marino (Lavens & Sorgeloos, 1996)	6
Tabla 1.2 Condiciones generalizadas para el cultivo de microalgas marinas (Lavens & Sorgeloos, 1996)	7
Tabla 1.3 Principales ventajas y desventajas de las técnicas de cultivo de microalgas (Chew et al., 2018; Klinthong et al., 2015; Lavens & Sorgeloos, 1996; Richmond & Hu, 2013)	11
Tabla 1.4 Ventajas y desventajas de varios tipos de FBRs (Ugwu et al., 2008)	13
Tabla 2.1 Especies de microalgas más cultivadas y máxima densidad alcanzada en tanques exteriores usando el método “Batch” en CENAIM (Reyes, 2018)	23
Tabla 2.2 Densidades de cosecha reportadas en CENAIM, usando el fotobiorreactor PBR100L®	24
Tabla 2.3 Densidades de microalga producidas en el CENAIM y otros laboratorios mediante el método “batch” y en fotobiorreactores (Lombardi & Wangersky, 1995 ^a ; Raes, Isdepsky, & Muylaert, 2013 ^b ; Renaud et al., 2002 ^c ; Ritcharoen et al., 2014 ^d ; Zhang & Richmond, 2003 ^e)	25
Tabla 2.4 Productividad de tres modelos de fotobiorreactores en diferentes especies de microalgas (Briassoulis et al., 2010 ^a ; Moheimani, 2013 ^b ; Travieso et al., 2001 ^c ; Watanabe & Saiki, 1997 ^d ; L. Xu, Weathers, Xiong, & Liu, 2009 ^e ; Z. Xu et al., 2002 ^f)	29
Tabla 3.1 Materiales usados para el diseño del fotobiorreactor helicoidal de bajo costo, con sus respectivos precios en dólares	35
Tabla 3.2 Cantidad de microalgas producidas en un área de 9m ² usando el método “Batch” y FBR del CENAIM y proyección de producción para FBR tubular helicoidal de bajo costo diseñado	39
Tabla 3.3 Costos de producción de <i>Nannochloropsis sp.</i> en método “Batch”, FBR del CENAIM y FBR propuesto	39

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del problema

En la industria acuícola nacional existen deficiencias para satisfacer la alta demanda de microalgas, en términos de calidad y concentración de los cultivos. En general, los laboratorios de producción acuícola y centros de investigación, como el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), utilizan el método tradicional “Batch” para la producción de fitoplancton que resulta deficiente y requiere de grandes volúmenes que ocupan un gran espacio físico, y dificultan tanto el manejo como la transferencia de los cultivos; bajo las condiciones de cultivo del CENAIM, se llega a producir hasta 8 ton diarias de microalgas, mientras que la demanda conjunta de las otras áreas de investigación puede llegar hasta 18 ton. En este sentido, los encargados de los laboratorios (e.g. Peces Marinos), requieren mayores concentraciones para disminuir volúmenes y facilitar el traslado a sus tanques de cultivo. Además, el método “Batch” requiere de mucha mano de obra para su mantenimiento, no logran producciones de alta calidad y sufren caídas abruptas de concentración debido a diversas fuentes externas de contaminación.

Existen sistemas alternativos de cultivo que carecen de las deficiencias del método tradicional, gracias a su capacidad de controlar y aprovechar de manera más eficiente los parámetros ambientales fundamentales, además de asegurar la inocuidad. Sin embargo, presentan un elevado costo económico que limita su implementación.

1.2 Justificación del problema

El presente proyecto pretende potenciar la producción de microalgas en el CENAIM y otras empresas que puedan adaptar el diseño, ya que estos microorganismos son una importante materia prima para muchas industrias, especialmente para la acuícola, la cual goza de una alta relevancia en Ecuador y el mundo, gracias a su acelerado crecimiento, que genera significativas cantidades de alimento, trabajo y dinero para la población.

Todos los organismos producidos por la acuicultura dependen directa o indirectamente de las microalgas, por lo cual, al suministrar a los cultivos acuícolas mayor concentración de microalgas de mejor calidad, es posible mejorar los índices de producción (factor de conversión alimenticia, tasa de crecimiento, supervivencia), permitiendo, en el caso de

CENAIM, facilitar las investigaciones y, por ende, contribuir al progreso de la industria acuícola.

Producir altas concentraciones de microalgas de alta calidad puede resultar económicamente costoso, impidiendo que pequeños y medianas empresas, aporten al desarrollo de la industria acuícola, creándose la necesidad por alternativas que permitan a estas entidades intensificar sus cultivos de microalgas, sin tener que invertir un alto capital económico.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Diseñar una alternativa adaptada al CENAIM, que permita la intensificación a bajo costo en el cultivo de microalgas, produciendo mayores concentraciones y mejor calidad de microalgas en el espacio físico disponible.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Plantear una alternativa que permita la intensificación en el cultivo de microalgas y se adapte a las condiciones físicas del CENAIM, asegurando su funcionamiento en el centro.
- Establecer un diseño a bajo costo de la alternativa planteada, permitiendo su posterior implementación en el CENAIM.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Características de las microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos eucariotas (e.g. Cianobacterias) o procariotas (e.g. Diatomeas). Se conoce que existen alrededor de 50,000 especies que viven en distintos ambientes como agua dulce, salada, estuarina, nieve, suelo, etc. Sin embargo, la mayoría de estos organismos se encuentran en el agua, donde son el primer eslabón de la cadena trófica (ilustración 1.1; Mata, Martins, & Caetano, 2010).

Las microalgas han sido utilizadas para varios fines, por ejemplo, como alimento suplementario para humanos, en la reducción de las emisiones de CO₂, tratamiento de aguas y la producción de metano (Burlew, 1953), alimento para animales (Knuckey, Brown, Robert, & Frampton, 2006), obtención de productos nutraceuticos (Shi, Jiang, & Chen, 2002), pigmentos (Del Campo, García-González, & Guerrero, 2007),

biocombustibles (Onumaegbu, Mooney, Alaswad, & Olabi, 2018), biocompuestos (Íliter et al., 2018) y biorremediación (Razzak, Ali, Hossain, & DeLasa, 2017).

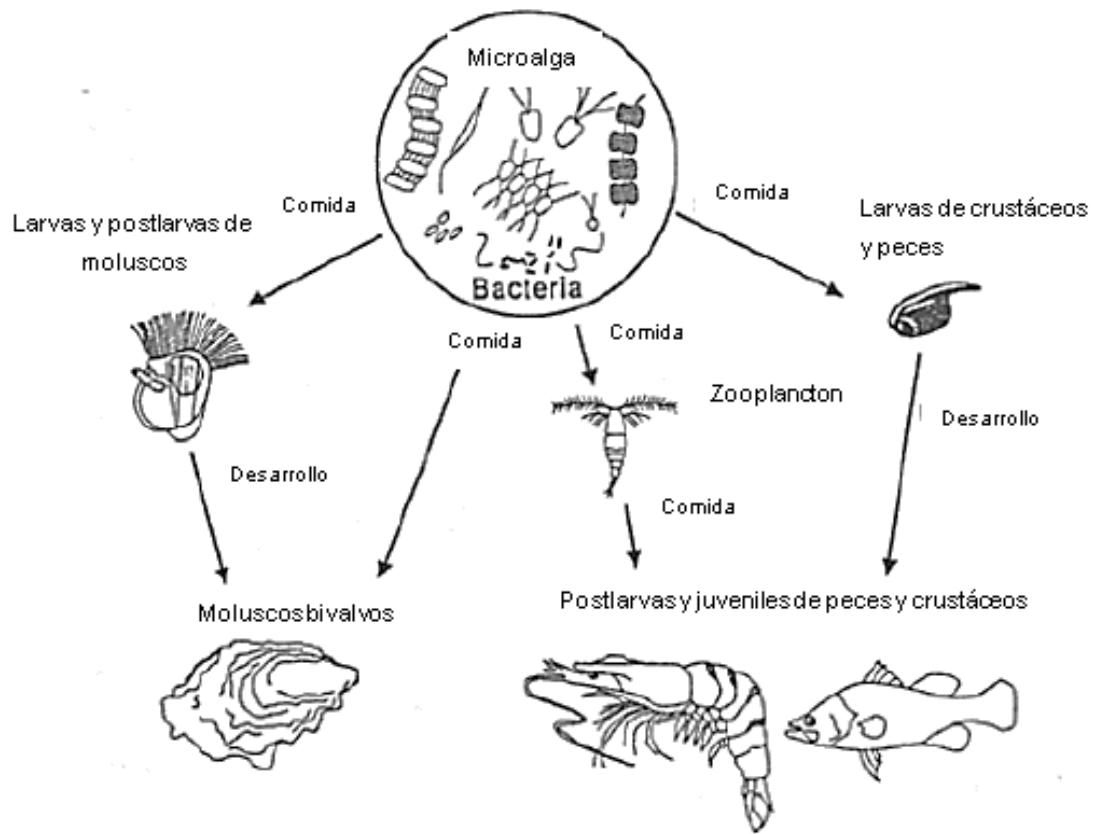


Ilustración 1.1 Cadena trófica en un ecosistema marino (Lavens & Sorgeloos, 1996)

Las microalgas se reproducen sexual o asexualmente, dependiendo de la especie, y para esto, necesitan de nutrientes provenientes del medio y energía (Burlew, 1953). Entre los nutrientes más importantes se encuentran: (i) Sales totales; (ii) Componentes iónicos principales como K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} y Cl^- ; (iii) Fuentes de nitrógeno; (iv) Fuentes de carbono; (v) Elementos traza y algunos agentes quelantes como EDTA; (vi) Vitaminas. (Richmond & Hu, 2013). En relación a la energía, estos microorganismos, la obtienen por fotosíntesis que es una reacción redox impulsada por la luz en la cual el CO_2 es convertido a carbohidratos y se libera O_2 como producto residual (Richmond & Hu, 2013).

El crecimiento de un cultivo de microalgas se mide con relación al aumento de la densidad poblacional, y consta de 5 fases: 1) Fase de Inducción, donde el crecimiento es limitado debido al proceso de adaptación fisiológica; 2) Fase exponencial, donde

ocurre un crecimiento acelerado del cultivo aprovechando al máximo los nutrientes y condiciones del medio (especie-específico); 3) Fase del declive de crecimiento, este estado ocurre cuando los nutrientes, luz, pH, CO₂ u otros factores físicos o químicos limitan la división celular; 4) Fase estacionaria, donde los factores limitantes y la tasa de crecimiento se equilibran, esto genera una densidad constante; y 5) Fase de muerte o “crash”, aquí, la calidad del agua se deteriora y los nutrientes se agotan, por ende la densidad empieza a disminuir significativamente hasta el colapso (Ilustración 1.2; Lavens & Sorgeloos, 1996).



Ilustración 1.2 Curva de crecimiento de microalgas con sus 5 fases (Lavens & Sorgeloos, 1996)

Bajo condiciones normales (*i.e.* cuando los nutrientes no son limitantes) las microalgas contienen alrededor de 25-50% de peso seco como proteínas, 5-40% como carbohidratos, 10-30% como lípidos y 5-40% como cenizas (Renaud, Tinh, & Parry, 1998; Subba Rao, 2006). Una descripción más detallada de la diversidad nutricional de distintas especies utilizadas en la acuicultura es realizada por Brown & Blackburn (2013). Por otro lado, los factores ambientales tales como temperatura, salinidad, pH, CO₂ disponible y/o densidad poblacional también afectan sobre el perfil nutricional de las microalgas. (Batista, Gouveia, Bandarra, Franco, & Raymundo, 2013).

1.4.2 Aplicaciones e importancia de las microalgas en acuicultura

La acuicultura es la industria de producción de alimento con mayor crecimiento a nivel global, y se ha convertido en la fuente principal de organismos acuáticos para el consumo

humano (Ottinger, Clauss, & Kuenzer, 2016). Según demuestran los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés; ilustración 1.3), desde el año 1990 la producción acuícola ha ido aumentando, mientras que la captura por pesquerías se ha estabilizado. Así, hasta el 2015 que la acuicultura llegó a producir aproximadamente 170 millones de toneladas mientras que la pesquería se mantuvo con aproximadamente 90 millones de toneladas.

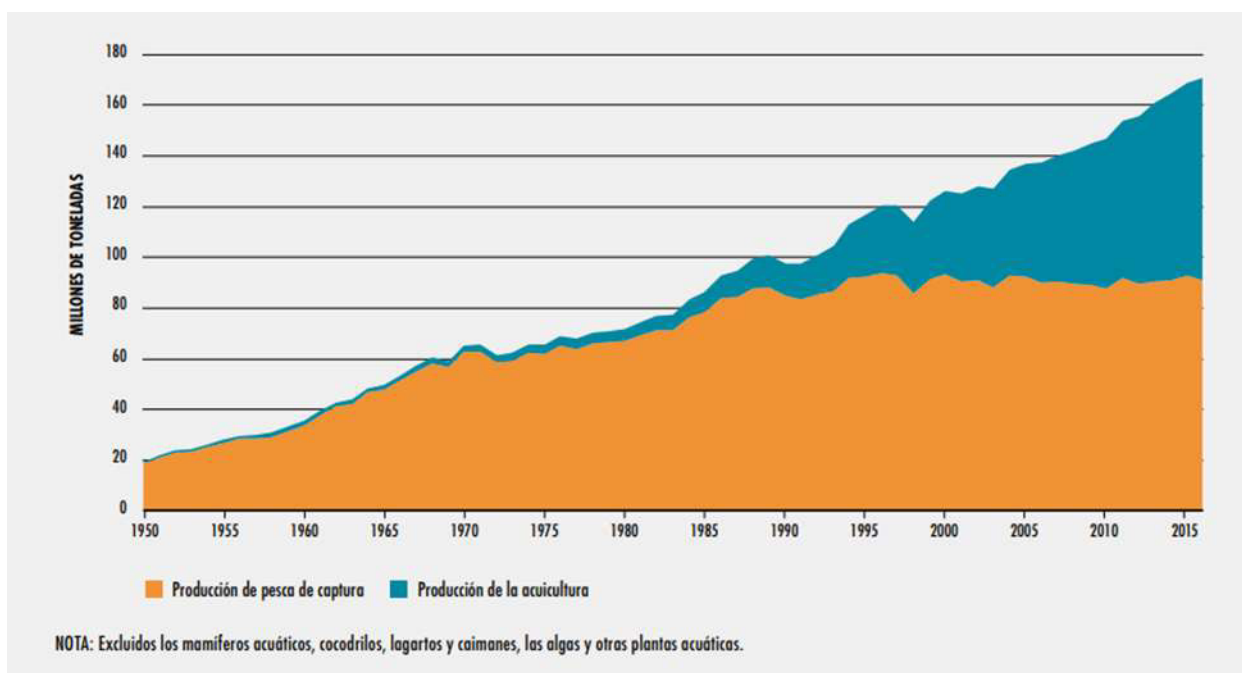


Ilustración 1.3 Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura. (FAO, 2018)

Las microalgas como primer eslabón de la cadena trófica en ecosistemas acuáticos (Lavens & Sorgeloos, 1996) son de mucha importancia para la industria acuícola como fuente de alimento para todos los estados de moluscos bivalvos, periodos larvarios de algunas especies de crustáceos, y estados tempranos de algunas especies de peces. También son usadas para producir zooplancton (rotíferos, copépodos, *Artemia*), los cuales se usan para alimentar estados larvarios y juveniles de crustáceos y peces (Muller-feuga, 2000). Además de ser usadas como alimento, las microalgas también juegan un rol importante en la estabilización de la calidad del agua y control microbiano, cualidad usada en acuicultura en la “técnica de aguas verdes”, generalmente aplicada en el cultivo de larvas de peces marinos (Papandroulakis, Divanach, Anastasiadis, & Kentouri, 2001).

1.4.3 Especies de microalgas más utilizadas en acuicultura

Solo unas cuantas, de la inmensa cantidad de microalgas existentes, se han aislado y son usadas en acuicultura (Tabla 1.1). Esta selección se realiza tomando en cuenta cualidades tales como: (i) Tamaño de célula apropiado para el organismo objetivo; (ii) Valor nutricional adecuado; (iii) Alta digestibilidad; (iv) Facilidad para la intensificación del cultivo; (v) Corto ciclo de vida, capacidad de reproducir en cautiverio; (vi) Tolerancia a variaciones en los parámetros ambientales (Conceição, Yúfera, Makridis, Morais, & Dinis, 2010).

Tabla 1.1 Cadena trófica en un ecosistema marino (Lavens & Sorgeloos, 1996)

Clase	Especie	Ejemplo de aplicación
<i>Bacillariophyceae</i>	<i>Skeletonema</i>	PL, BL, BP
	<i>Thalassiosira</i>	PL, BL, BP
	<i>Phaedactylum</i>	PL, BL, BP, ML, BS
	<i>Chaetoceros</i>	PL, BL, BP, BS
	<i>Cylindrotheca</i>	PL
	<i>Bellerochea</i>	BP
	<i>Actinocyclus</i>	BP
	<i>Nitzschia</i>	BS
	<i>Cyclotella</i>	BS
	<i>Navicula</i>	PL
<i>Haptophyceae</i>	<i>Isochrysis</i>	PL, BL, BP, ML, BS, GW
	<i>Pseudoisochrysis</i>	BL, BP, ML
	<i>Dicrateria</i>	BP
<i>Chrysophyceae</i>	<i>Monochrysis (Pavlova)</i>	BL, BP, BS, MR
<i>Prasinophyceae</i>	<i>Tetraselmis (Platymonas)</i>	PL, BL, BP, AL, BS, MR
	<i>Pyramimonas</i>	BL, BP
	<i>Micromonas</i>	BP
<i>Cryptophyceae</i>	<i>Chroomonas</i>	BP
	<i>Cryptomonas</i>	BP
	<i>Rhodomonas</i>	BL, BP
	<i>Chlamydomonas</i>	BL, BP, FZ, MR, BS
	<i>Chlorococcum</i>	BP
<i>Xanthophyceae</i>	<i>Olisthodiscus</i>	BP
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Carteria</i>	BP
	<i>Dunaliella</i>	BP, BS, MR
	<i>Chlorella</i>	GW, FZ, BS
	<i>Nannochloropsis</i>	GW, BS
<i>Cyanophyceae</i>	<i>Spirulina</i>	PL, BP, BS, MR
<i>Dinoflagellater</i>	<i>Heterocapsaniei</i>	BS
PL, larvas de camarón penaeidae; BL, larvas de moluscos bivalvos; ML larvas de camarón de agua dulce; BP, postlarvas de moluscos bivalvos; MR, rotíferos marinos; BS, artemia; FZ, zooplankton de agua dulce; GW, aguas verdes.		

1.4.4 Condiciones para el cultivo

1.4.4.1 Condiciones físicas y químicas

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las microalgas son: cantidad y calidad de nutrientes, luz, pH, turbulencia y temperatura (Kim et al., 2012). Es importante considerar que los rangos de tolerancia y los niveles óptimos de estos parámetros son especie-específicos. Sin embargo, Lavens & Sorgeloos (1996) agrupan esta información para las microalgas marinas de importancia en la acuicultura, como se muestra en la tabla 1.2.

Tabla 1.2 Condiciones generalizadas para el cultivo de microalgas marinas (Lavens & Sorgeloos, 1996)

Parámetros	Tolerancia	Óptimo
Temperatura (°C)	16-27	18-24
Salinidad (g.L ⁻¹)	12-40	20-24
Intensidad de luz (lux)	1,000-10,000 (depende del volumen y densidad)	2,500-5,000
Fotoperiodo (Luz: Oscuridad; Horas)		16:8 (mínimo) 24:0 (máximo)
pH	7-9	8.2-8.7

1.4.4.2 Medio de cultivo / nutrientes

Las concentraciones de microalgas en los sistemas de cultivo son mayores a las encontradas en la naturaleza. Por esta razón, los cultivos deben ser enriquecidos con nutrientes para compensar la deficiencia en el agua natural. Los medios más utilizados para fertilizar el agua de cultivo son: Walne y Guillard F/2 (Neil et al., 2017). Estos enriquecedores aportan macronutrientes (nitratos, fosfatos y silicatos) y micronutrientes (metales traza, vitaminas B₁, B₁₂ y a veces biotina). Cabe mencionar que los silicatos se usan especialmente para el cultivo de diatomeas, las cuales utilizan este componente para producir su caparazón/valvas externo (Richmond & Hu, 2013).

1.4.4.3 Luz

Las microalgas realizan la fotosíntesis y es la luz (natural o artificial) la fuente de energía para realizar esta reacción. Debido a esto, la intensidad, calidad espectral de la luz y fotoperiodo deben ser considerados (Lavens & Sorgeloos, 1996). Sin embargo, su

requerimiento puede variar dependiendo de la profundidad y la densidad del cultivo, entre mayor sean estas variables mayor será la intensidad lumínica requerida para lograr penetrar a través del cultivo (e.g. 1,000 lux es adecuado para cultivos en matraces “Erlenmeyer”; 5,000-10,000 lux es necesario para mayores volúmenes; Lavens & Sorgeloos, 1996).

La intensidad de luz puede llegar a ser un factor limitante: Si la intensidad de luz es demasiado baja, la respiración celular consume los compuestos de carbono a mayor grado de lo que se produce en la fotosíntesis y, como resultado, no se genera nueva biomasa. Por otro lado, si la intensidad de luz es demasiado alta, se produce la fotoinhibición donde radicales libres causan daño foto-oxidativo, y en casos más severos, la muerte celular (Mata et al., 2010). A pesar de lo dañino que puede ser la fotoinhibición, existen estudios que aprovechan esta característica para aumentar la eficiencia fotosintética en la producción de microalgas, usando el efecto de destello, el cual consiste en someter a las microalgas a cortos destellos de luz de alta intensidad usando turbulencia, circulación del agua o luz artificial (ilustración 1.4; Abu-Ghosh, Fixler, Dubinsky, & Iluz, 2016).

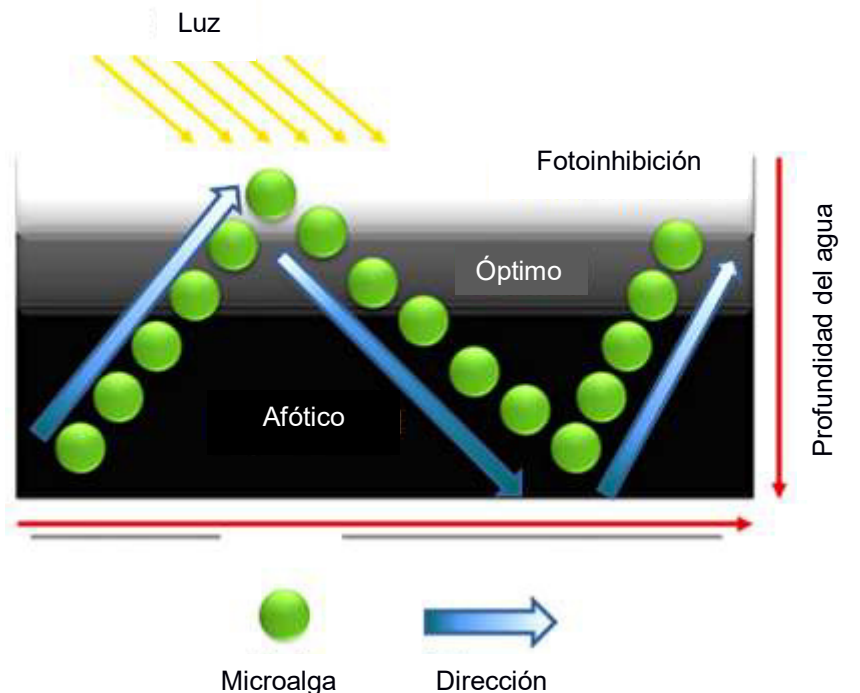


Ilustración 1.4 Diagrama esquemático del efecto destello en microalgas como resultado del mezclado en un sistema de cultivo (Abu-Ghosh et al., 2016)

En el cultivo de microalgas los espectros de luz azul y rojo son preferidos para realizar eficientemente la fotosíntesis, estos espectros se encuentran en la luz natural y se pueden usar selectivamente usando luz artificial (Richmond & Hu, 2013). Por último, la duración de la iluminación debe ser como mínimo 18 horas por día para un desarrollo normal del cultivo (Lavens & Sorgeloos, 1996).

1.4.4.4 pH

Los cultivos de microalgas pueden colapsar debido a la disrupción de varios procesos celulares como resultado del mal control del pH. Se conoce que el rango de pH de la mayoría de las especies de microalgas es de entre 7 a 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7. Por lo tanto, en los cultivos intensivos, que pueden elevarse hasta más de 9 de pH debido a crecimiento del cultivo, es necesario corregir el pH con la adición de CO₂ (Goldman, Azov, Riley, & Dennett, 1982).

1.4.4.5 Aeración/mezclado

El mezclado es necesario para prevenir la sedimentación de las microalgas, asegurar que todas las células estén igualmente expuestas a la luz y nutrientes, evitar la estratificación térmica y mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire. Esto último es de gran importancia ya que el aire contiene la fuente de carbono para la fotosíntesis (CO₂), aunque ocupa solo 0.03% de la composición total del aire. Por lo tanto, para cultivo intensivos es necesario suplementar CO₂ puro al cultivo mediante el sistema de aeración. Además, el CO₂ hace la función de buffer contra la variación de pH, como resultado del balance CO₂/HCO₃⁻ (Lavens & Sorgeloos, 1996).

1.4.4.6 Temperatura

La temperatura óptima para la mayoría de las especies de fitoplancton está entre 20 y 24°C, aunque puede variar dependiendo de la composición del medio de cultivo, las especies y la cepa cultivada. Además, temperaturas menores a los 16°C disminuyen la tasa de crecimiento del cultivo, mientras que mayores a 35°C son letales para las microalgas (Lavens & Sorgeloos, 1996; Renaud, Thinh, Lambrinidis, & Parry, 2002).

1.4.4.7 Salinidad

Varios estudios se han realizado para comprobar el efecto de la salinidad sobre el crecimiento del cultivo y contenido de lípidos, los mejores resultados se han encontrado a salinidades iguales o ligeramente menores a los del hábitat de la especie (Pal, Khozin-Goldberg, Cohen, & Boussiba, 2011; Ruangsomboon, 2012; Takagi, Karseno, & Yoshida, 2006).

1.4.5 Métodos de cultivo

Las microalgas pueden producirse usando una gran variedad de métodos, desde métodos intensivos, donde se controlan todos los parámetros ambientales, nutrientes y contaminación en sistemas cerrados, hasta métodos menos controlados e impredecibles en tanques exteriores (Lavens & Sorgeloos, 1996; Richmond & Hu, 2013). La terminología usada para describir los tipos de cultivo de microalgas incluye:

- Interiores / Exteriores. Los cultivos interiores permiten un control sobre la iluminación (luz artificial), temperatura, niveles de nutrientes, contaminación. A diferencia de los exteriores que son más propensos a sufrir caídas en la producción por su falta de control en los parámetros. Los sistemas exteriores son más baratos y aprovechan la luz natural (Klinthong, Yang, Huang, & Tan, 2015).
- Cerrados / Abiertos. Los cultivos abiertos son aquellos que no tienen cobertura y están en contacto con el medio externo (e.g. estanques y tanques interiores o exteriores), haciéndolos más propensos a la contaminación. Mientras que los cultivos cerrados (e.g. frascos, bolsas, carboys) son menos propensos a la contaminación, por lo tanto son más eficientes aunque más costosos (Chew et al., 2018).
- Axénicos / No axénicos. Los cultivos axénicos están libres de cualquier otro organismo ajeno al cultivo (e.g. bacterias), por lo tanto, requieren de una estricta esterilización de todo el sistema y medios de cultivo, lo que los hace menos prácticos para operaciones de producción a gran escala. Mientras que, en los cultivos no axénicos se puede encontrar la presencia de otros organismos que pueden no ser estrictamente perjudiciales (Lavens & Sorgeloos, 1996).
- Por lote ("Batch"). Consiste en la inoculación de microalgas en contenedores con agua fertilizada durante varios días para permitir el crecimiento del cultivo. Una vez disminuida la tasa de crecimiento debido a que los nutrientes se convierten en limitantes, el cultivo se pasa de forma progresiva a otro contenedor con mayor volumen y medio enriquecido, o es cosechado. La fase inicial del cultivo empieza como interior, haciendo uso de tubos de ensayo, matraces, carboys, y termina en tanques exteriores de gran volumen. Esta técnica toma entre 25 a 30 días en llegar al cultivo masivo (Roleda et al., 2013).
- Continuo / Semi-continuo. Un cultivo continuo es aquel que recibe constantemente agua fertilizada con el fin de mantener el crecimiento exponencial de las

microalgas. Por otro lado, el semi-continuo prolonga el tiempo de uso de grandes tanques de cultivo, realizando cosechas parciales e inmediatamente reponiendo el volumen cosechado con agua fertilizada (Lavens & Sorgeloos, 1996).

Es importante notar que estas terminologías pueden aplicarse simultáneamente. Por ejemplo, existen sistemas de cultivo interiores y abiertos. La tabla 1.3 resume las principales ventajas y desventajas de los métodos antes mencionados.

Tabla 1.3 Principales ventajas y desventajas de las técnicas de cultivo de microalgas (Chew et al., 2018; Klinthong et al., 2015; Lavens & Sorgeloos, 1996; Richmond & Hu, 2013)

Tipo de cultivo	Ventajas	Desventajas
Interior	Control del cultivo	Costoso
Exterior	Barato	Poco control del cultivo
Cerrado	Menos propenso a contaminación	Costoso
Abierto	Barato	Propenso a contaminación
Axénico	Menos propenso a sufrir caídas de producción	Complicado manejo, costoso
No axénico	Barato, fácil manejo	Propenso a sufrir caídas en la producción
Batch	Barato, fácil manejo	Propenso a contaminación, calidad esporádica
Continuo	Eficientes, provee un constante suministro de células de alta calidad, automatizado	Costoso, usualmente solo se puede usar en pequeña escala, complejo
Semi-continuo	Fácil manejo, eficiente	Calidad esporádica

1.4.6 Sistemas de cultivo

1.4.6.1 Cultivos en tanques, estanques y raceways

Son cultivos exteriores y abiertos, cuyo principio es fertilizar el agua para lograr un bloom de algas y generar movimiento del medio usando paletas o mangueras de aeración para evitar la sedimentación de las microalgas. Generalmente se usan en la producción a gran escala por su simple construcción y fácil operación. Para la fertilización, es común usar fertilizantes de escala industrial cuyo contenido es similar a los usados en laboratorios (Lavens & Sorgeloos, 1996; Lee, 2001).

La ventaja de los tanques y estanques radica en que son baratos debido a su simple construcción y manejo, pero tienen sus limitaciones, las cuales son: (i) pobre utilización

de luz; (ii) pérdidas por evaporación; (iii) difusión del CO₂ a la atmósfera (iv) requerimiento de grandes áreas; y, (v) contaminación por protozoarios, bacterias y virus. Por otro lado, los raceways son contruidos como un canal o un grupo de ellos, con una profundidad entre 15 y 25 cm y aunque son un poco más eficientes en cuanto a producción debido a la hidrodinámica del sistema, sufren las mismas limitaciones del cultivo en estanques (Klinthong et al., 2015; Ugwu, Aoyagi, & Uchiyama, 2008; ilustración 1.5).



Ilustración 1.5 Sistemas de cultivo de microalgas. A la izquierda un raceway, a la derecha un estanque circular (Klinthong et al., 2015)

1.4.6.2 Fotobiorreactores (FBRs)

El fotobiorreactor es un sistema de cultivo cerrado que puede ser: Continuo o semi-continuo; axénico o no-axénico; e, interior o exterior. Además, estos sistemas mantienen producciones constantes (Lavens & Sorgeloos, 1996; Richmond & Hu, 2013).

Existen una gran variedad de modelos de FBRs, de los cuales los más usados son: (i) Panel plano; (ii) columna vertical; (iii) tubular (Richmond & Hu, 2013; Ugwu et al., 2008; Tabla 1.4).

Tabla 1.4 Ventajas y desventajas de varios tipos de FBRs (Ugwu et al., 2008)

Fotobiorreactor	Ventajas	Desventajas
Panel plano	Gran área de superficie de iluminación; eficiente en exteriores; alto aprovechamiento de luz; relativamente barato; fácil limpieza	Dificultad para controlar temperatura; cierto crecimiento de microalgas en las paredes; dependiendo de la especie de microalga, puede sufrir estrés hidrodinámico
Columna vertical	Alta transferencia de masa; buen mezclado sin estrés hidrodinámico; fácil de esterilizar; fotoinhibición reducida	Pequeña área de superficie de iluminación; requiere cierta tecnificación
Tubular	Gran área de superficie de iluminación; eficiente en exteriores; relativamente barato	Fluctuaciones de pH; cierto crecimiento de microalgas en las paredes; ocupa un alto espacio físico

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Cultivo de microalgas en CENAIM.

El CENAIM, para la producción de microalgas, ha utilizado el sistema batch y en el año 2018 adquirió un Fotobiorreactor PBR100L® (Industrial Planckton, FI, EE.UU). A continuación, se describen los procesos de cultivo en cada sistema.

2.1.1 Método “Batch”.

Se describió el proceso de este método y se elaboró un esquema del área destinada para este proceso (ilustración 2.1). En el CENAIM se ha usado el método “Batch” para la producción de microalgas (ilustración 2.2), cuenta con dos fases para el cultivo: Interior y exterior. La interior es realizada desde la inoculación de la cepa en un volumen de 10 mL de medio fertilizado con Guillard F/2, hasta carboys de 100 y 300 L. En esta etapa se mantiene una temperatura entre 21 – 22 °C, aeración constante y filtrada (excepto en 10 mL), 24 h con luz artificial (3000 lux), y, agua filtrada y esterilizada con luz ultravioleta (UV). Por otro lado, la fase exterior se ejecuta en tanques de 1 y 2 ton, donde, a diferencia de la fase interior, se mantiene con temperatura ambiental y fotoperiodos variados dependiendo de las condiciones climáticas. Para los tanques de 1 y 2 ton es usado un fertilizante comercial (Fitobloom®, Agripac, Gye. Ecuador). Bajo estas condiciones se ha producido, en la fase exterior de cultivo, las densidades máximas mostradas en la tabla 2.1. Sin embargo, cabe recalcar que: (i) Estas densidades no han sido constantes y suelen ser menores; (ii) Las densidades de los carboys de 100 y 300 L, en comparación con los tanques exteriores, han sido mayores y se llega a perder hasta el 50% del cultivo en la última etapa del cultivo (Reyes, 2018).

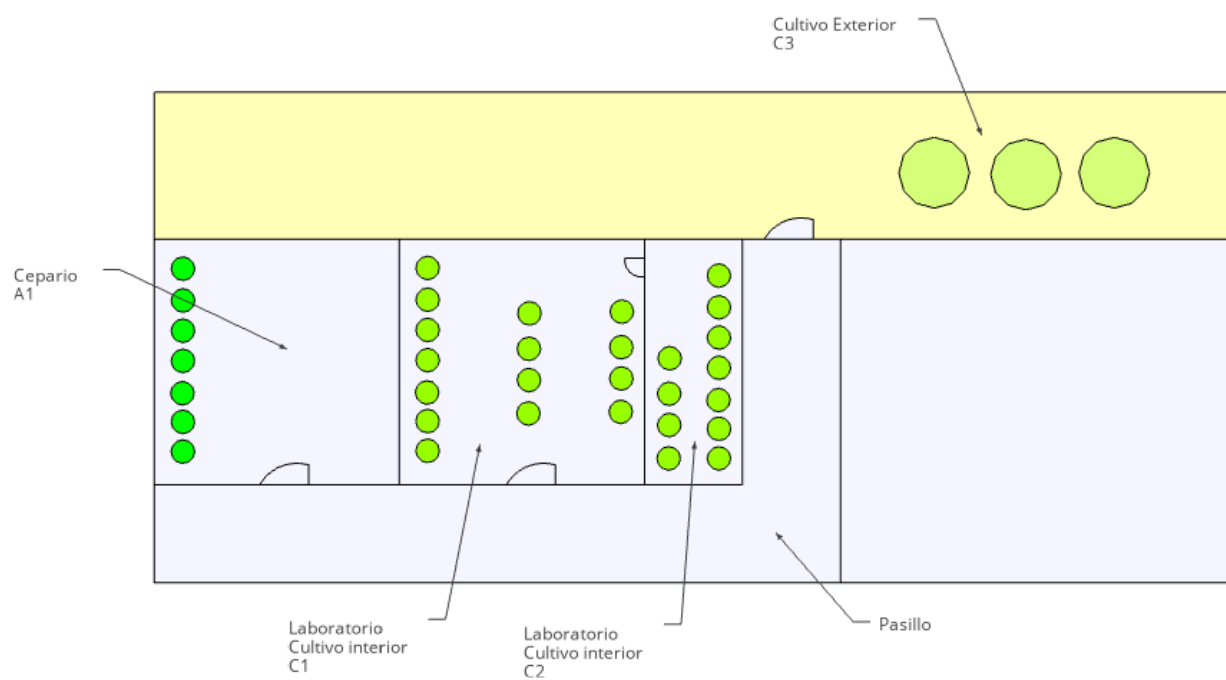


Ilustración 2.1 Esquema representativo de las áreas dispuestas para el cultivo de microalgas en CENAIM

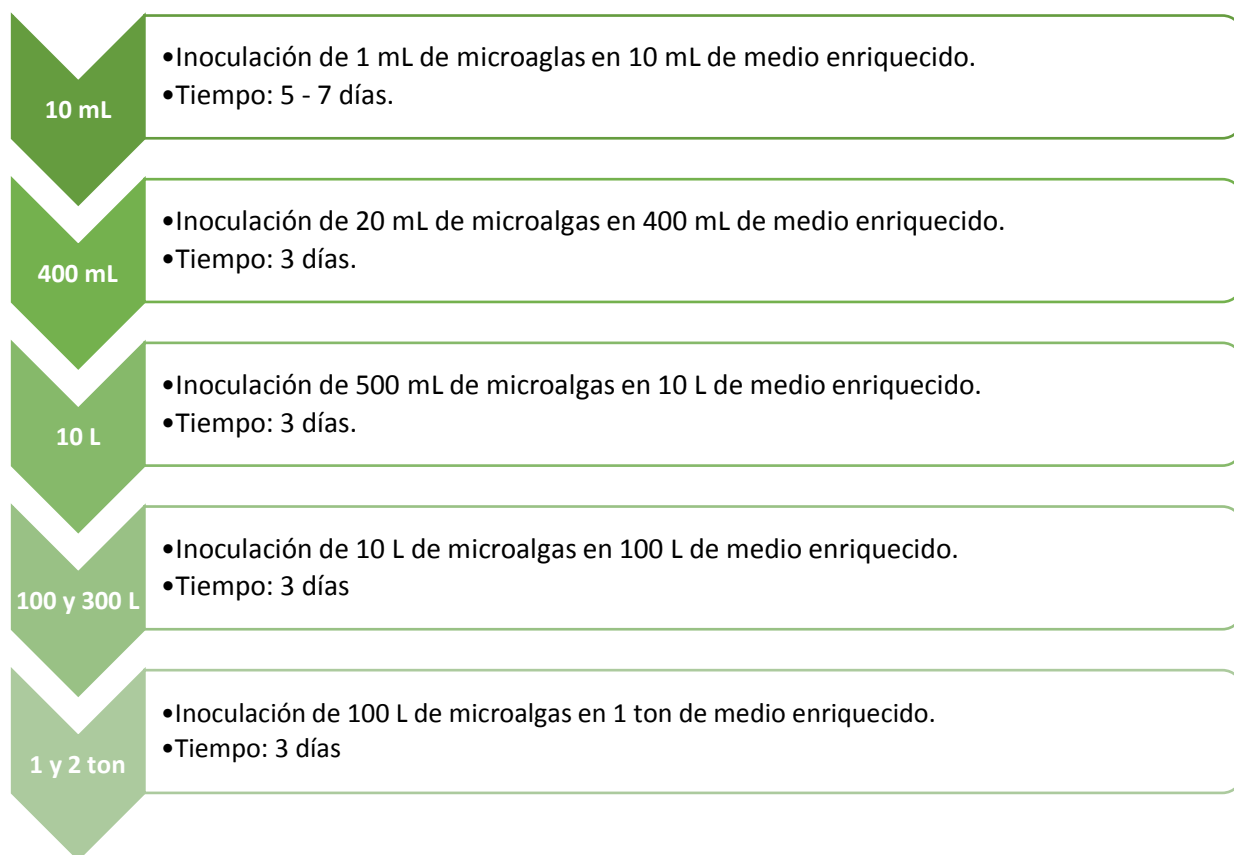


Ilustración 2.2 Aumento de volúmenes de cultivo empleado en el CENAIM usando el método “Batch” (Reyes, 2018)

Tabla 2.1 Especies de microalgas más cultivadas y máxima densidad alcanzada en tanques exteriores usando el método “Batch” en CENAIM (Reyes, 2018)

Especie	Densidad (cel/ml)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	1,500,000
<i>Tetraselmis maculata</i>	200,000
<i>Tisochrysis lutea (Isochrysis galbana)</i>	1,200,000
<i>Chlorella sp.</i>	1,000,000
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	800,000
<i>Nannochloropsis sp.</i>	10,000,000
<i>Rhodomonas sp.</i>	600,000

2.1.2 Fotobiorreactor PBR100L®

Está ubicado en el área A1 del CENAIM. El cultivo en este sistema empieza por la calibración por presión y voltaje dependiendo de la especie a cultivarse, luego, el equipo es llenado con 80L

de agua salada filtrada (10, 2 y 1 μm) y esterilizada por UV y posteriormente inoculado con 20 L de microalgas producidas mediante el método “Batch”. Así, una vez calculada la curva de crecimiento de cada especie, el equipo se encarga, automáticamente, de cosechar, añadir agua, nutrientes y controlar temperatura gracias a un intercambiador de calor y pH mediante la adición de CO_2 . Las recientes cosechas han tenido las densidades que se muestran en la tabla 2.2, cada 7 días.

Tabla 2.2 Densidades de cosecha reportadas en CENAIM, usando el fotobiorreactor PBR100L®

Especie	Densidad (cel/mL)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	8,000,000
<i>Tetraselmis maculata</i>	6,000,000
<i>Tisochrysis lutea (Isochrysis galbana)</i>	17,000,000

2.2 Alternativas para la Intensificación del cultivo de microalgas en CENAIM.

Para lograr intensificar el cultivo, se estudiaron dos alternativas. La primera fue la optimización del protocolo de cultivo usado tradicionalmente en el CENAIM, identificando y planteando soluciones a problemas puntuales que afectaban la concentración de microalgas producidas. Como segunda alternativa se planteó integrar fotobiorreactores al cultivo de microalgas, ya que las densidades de microalgas producidas en estos sistemas son mucho más altas que el método “batch” (tabla 2.3), debido al control y la inocuidad que brinda al cultivo. Además, el tiempo de cultivo del método “batch” toma hasta 20 días (Reyes, 2018), mientras que los fotobiorreactores permiten cosechas continuas diarias, después de 4 – 7 días del primer inóculo (Ritcharoen et al., 2014; Zhang & Richmond, 2003).

Tabla 2.3 Densidades de microalga producidas en el CENAIM y otros laboratorios mediante el método “batch” y en fotobiorreactores (Lombardi & Wangersky, 1995^a; Raes, Isdepsky, & Muylaert, 2013^b; Renaud et al., 2002^c; Ritcharoen et al., 2014^d; Zhang & Richmond, 2003^e)

Especie	Densidad de cosecha (cel/mL)			
	“Batch” - CENAIM	Fotobiorreactor - CENAIM	“Batch” – Otros laboratorios	Fotobiorreactores
<i>Chaetoceros gracilis</i>	1,500,000	8,000,000	900,000 ^a	12,000,000 ^d
<i>Tetraselmis maculata</i>	200,000	6,000,000	-	800,000 ^b
<i>Tisochrysis lutea</i> (<i>Isochrysis galbana</i>)	1,200,000	17,000,000	2,850,000 ^a	28,000,000 ^e
<i>Rhodomonas sp.</i>	600,000	-	590,000 ^c	-

2.2.1 Revisión e identificación de problemas en el protocolo de cultivo de microalgas en CENAIM

Se realizaron entrevistas a la encargada del laboratorio de Fitoplancton (Lcda. Doris Reyes) y se hizo un seguimiento del proceso completo de cultivo. Además de las limitaciones propias del método de cultivo por lotes y el uso de tanques exteriores descritas anteriormente (apartado 1.4.6.1), el principal problema identificado fue la falta de control sobre la contaminación externa. Se observó que los operadores del área de fitoplancton no contaban con el equipo apropiado dentro del laboratorio (e.g. gorros, mandil, guantes, mascarillas). Además, se notaba la presencia de insectos flotando en el medio de cultivo de los tanques exteriores. Por otro lado, a pesar de que los utensilios eran esterilizados haciendo uso de la autoclave o por métodos químicos, estos podían volver a contaminarse fácilmente, ya que, tanto la autoclave como el área de limpieza de tanques, estaban mal ubicados, haciendo que estos materiales sean trasladados por el pasillo principal. Otra fuente de contaminación la reportó encargada del laboratorio, aseguró la entrada de organismos contaminantes por esta vía, ya que la aeración es compartida con otras áreas del centro y no es posible una limpieza completa de las vías.

Otro problema identificado fue el poco control sobre la intensidad lumínica recibida por el cultivo. A pesar de que, en la fase interior, las microalgas estaban expuestas a lámparas con intensidad de 3,000 lux, ésta no era totalmente aprovechada, ya que los materiales utilizados no facilitan el paso de la luz (e.g. fibra de vidrio, vidrio transparente, plástico transparente). Además, el mezclado del medio en los tanques exteriores, realizado por una piedra difusora a un lado o en el centro del tanque, no permitía que las microalgas reciban de manera homogénea la luz natural, ya que, muy probablemente, las células que estaban en el fondo y lejos de la aeración no eran suspendidas y se mantenían en una zona afótica. Por lo tanto, se plantearon algunas correcciones al protocolo de producción.

2.2.2 Análisis de fotobiorreactores para su implementación al cultivo de microalgas en CENAIM

No es válido afirmar que existe un modelo de fotobiorreactor que sea mejor, la gran variedad de modelos existe debido a que la eficacia y el uso de estos sistemas depende de las condiciones del medio, mas no del modelo. Teniendo esto en cuenta, se realizó una primera selección de los modelos, considerando aquellos que cumplan con los siguientes requisitos: (i) adaptabilidad a las condiciones del laboratorio de microalgas (C1) de CENAIM, debido a que esta área es menos contaminada que el exterior, cuenta con suministro de aeración filtrada, agua filtrada y desinfectada por UV, electricidad y un ambiente a temperatura de entre 22-24°C; (ii) disponibilidad de materiales de bajo costo para su construcción; (iii) fácil manejo y mantenimiento. Como consecuencia, fueron identificados 3 modelos: FBR vertical - “airlift”, FBR vertical – bolsas y FBR tubular helicoidal. De estos 3 modelos seleccionados, se compararon en términos de productividad para determinar la propuesta definitiva.

2.2.2.1 FBR vertical – “airlift”

Se realizó una descripción del FBR vertical tomando como referencia los trabajos de García, Contreras, Fernández, Acién, & Molina, (1999); Nitin Thukral (2015); Singh & Sharma, (2012). Su funcionalidad se basa en realizar un mezclado eficiente, en un tanque, haciendo uso del “airlift”, que consiste en combinar aire en una porción de agua logrando disminuir su densidad y por consecuencia elevando esa porción a la superficie. Las partes fundamentales de este fotobiorreactor son: Tanque transparente, tubo transparente, difusor de aire y soplador. A este modelo se le puede integrar CO₂ puro a la entrada de aire, para una correcta intensificación. Además, dispositivos que permitan

un mejor control sobre el cultivo como sondas de pH, oxígeno disuelto (OD) y temperatura (ilustración 2.3). Por otro lado, hace uso de luz artificial la cual incide en el cultivo por los laterales del tanque.

Las ventajas de este modelo residen en su alta transferencia de masa, mezclado eficiente sin producir estrés hidrodinámico, fácil manejo y esterilización. Así mismo, las desventajas consisten en su dificultad para trabajar con grandes volúmenes y bajo aprovechamiento de luz debido a la pequeña superficie de iluminación.

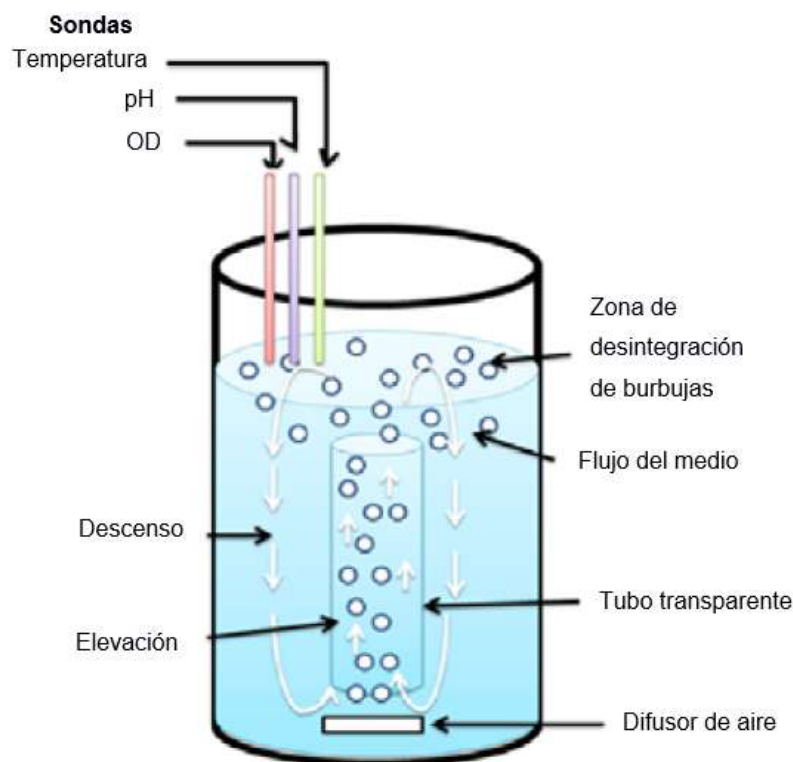


Ilustración 2.3 Diseño y funcionamiento de un FRB vertical – “airlift” (Nitín Thukral, 2015)

2.2.2.2 FBR vertical – bolsas.

Basándose en los trabajos de Quader & Ahmed, (2017); Singh & Sharma, (2012), se describió este modelo de FBR como uno sencillo, consta de una bolsa plástica colgada de ambos extremos y aeración integrada en el fondo que evita la sedimentación de las microalgas (ilustración 2.4). Así mismo, la iluminación incide en el cultivo de manera lateral y puede ser integrado CO₂ en la aeración.

La ventaja de este modelo consiste principalmente en su bajo costo de implementación a corto plazo, mientras que las desventajas residen en su corto tiempo de vida útil debido

al crecimiento algal en las paredes de las bolsas, bajo aprovechamiento de luz y dificultad en el manejo del cultivo (muestreo y cosecha).



Ilustración 2.4 Fotobiorreactor vertical – bolsas, fotografía tomada en “ExxonMobil’s greenhouse” ubicado en La Jolla, California.

2.2.2.3 FBR tubular helicoidal.

Se describió este modelo mediante los trabajos realizados por (Briassoulis et al., 2010b; Carvajal Oses, Chacón Guzmán, & Herrera Ulloa, 2018; Travieso, Hall, Rao, Benã, & Sã, 2001; Wang, Lan, & Horsman, 2012). Se divide en dos partes, la fotocelda y el colector. La fotocelda consiste en una manguera transparente enrollada a una estructura cilíndrica que le da una forma helicoidal, por la parte interna del cilindro se disponen lámparas que brindan luz artificial al sistema y, además, hace uso de bombas de agua o del sistema de “airlift” para hacer circular el medio de cultivo por la manguera y a través del colector. Así mismo, el colector es un tanque, generalmente de pequeño diámetro, que está conectado a la fotocelda, donde se realiza la cosecha o recolección de muestras mediante una llave de paso y, además, se le puede integrar sondas para medir parámetros ambientales como OD, temperatura y pH. La aplicación de CO₂ al cultivo puede integrarse en el colector, fotocelda o junto a la aeración (ilustración 2.5).

Las ventajas de este modelo son: (i) El buen aprovechamiento de la luz, ya que las mangueras de pequeño diámetro permiten que la luz sea recibida por la mayoría de las microalgas a pesar de las altas densidades de cultivo; (ii) Idóneo para interiores o

exteriores. Mientras que la desventaja radica en que las cantidades de oxígeno producido por las microalgas y por acción del “airlift”, en el caso de que se utilice, se llegan a acumular en la manguera de la fotocelda, produciendo una inhibición al crecimiento del cultivo. Sin embargo, esta desventaja puede ser mermada aplicando un desgasificador al final de la fotocelda para liberar el oxígeno a la atmosfera.



Ilustración 2.5 Fotobiorreactor tubular helicoidal (Briassoulis et al., 2010)

2.2.3 Criterio de selección de la alternativa para la intensificación del cultivo.

El criterio con el cual se compararon los distintos modelos planteados fue la productividad (tabla 2.4).

Tabla 2.4 Productividad de tres modelos de fotobiorreactores en diferentes especies de microalgas (Briassoulis et al., 2010^a; Moheimani, 2013^b; Travieso et al., 2001^c; Watanabe & Saiki, 1997^d; L. Xu, Weathers, Xiong, & Liu, 2009^e; Z. Xu et al., 2002^f)

Especie de microalga	Productividad (g L ⁻¹ d ⁻¹)		
	Tubular helicoidal	Vertical - “Airlift”	Vertical - Bolsa
<i>Chlorella sp.</i>	0.68 ^d	0.21 ^f	0.08 ^b
<i>Nannochloropsis sp.</i>	3.03 ^a	-	-
<i>Spirulina sp.</i>	0.40 ^c	-	-
<i>Tetraselmis suecica</i>	-	0.49 ^e	0.09 ^b

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Mejora del protocolo de manejo en cultivo “Batch” del CENAIM

Las correcciones planteadas fueron: (i) Fomentar el uso del equipo de laboratorio completo por parte de los operadores del área; (ii) Ubicar uno de los autoclaves, que se encontraba en el pasillo, dentro del área C2 para evitar contaminación de los materiales esterilizados; (iii) Instalar un aerador de 2 HP exclusivo para el área de fitoplancton, que abastezca a todo el laboratorio y tanques exteriores, para disminuir la incidencia de contaminantes por esta vía (vi) Establecer un material transparente para todos los recipientes de cultivo, permitiendo el correcto paso de la luz; (v) Medir la intensidad real que está recibiendo el cultivo, con el fin de hacer correcciones en la distancia de las lámparas con relación al medio del cultivo o el ángulo de incidencia de la luz; (vi) Integrar mangueras difusoras en el fondo de los tanques exteriores para lograr un mezclado eficiente de toda la columna de agua y luz artificial para su uso en las noches o días nublados, para aumentar el aprovechamiento de la luz por parte del cultivo (figura 3.6).

3.2 Planteamiento de un fotobiorreactor para la intensificación de los cultivos microalgas del CENAIM

Para la selección del modelo del fotobiorreactor, se consideró la productividad (tabla 2.4), eligiéndose el FBR tubular helicoidal para la realización del diseño de bajo costo. Se optó entonces por integrar un fotobiorreactor para la producción de microalgas en el CENAIM, manteniendo un cultivo por “Batch” durante las primeras fases y los tanques exteriores para mantener cantidades extras de microalgas en caso de ser necesario. A este nuevo protocolo de producción se le deberá aplicar las mejoras planteadas en el apartado 3.1.

3.3 Diseño de bajo costo de un FBR tubular helicoidal.

Basándose en los trabajos de Briassoulis et al., (2010) y Carvajal Oses et al., (2018), el diseño del fotobiorreactor se realizó en dos partes: Fotocelda y colector.

3.3.1 Fotocelda

Fue diseñada haciendo uso de 100 metros de manguera de policloruro de vinilo (PVC) transparente con diámetro interno de 25.4 mm, manteniendo un volumen aproximado de

55 L, esta manguera estará enrollada con una pendiente de 2 grados alrededor de una estructura de malla metálica de 1.90 m de altura y 0.67 m de diámetro. Además, será inyectado aire en la parte media superior de la fotocelda para lograr la circulación del medio mediante “airlift”, y, CO₂ en la base para controlar pH y aportar carbono al cultivo. El oxígeno excedente, producido por las microalgas, será liberado mediante un desgasificador colocado al final de la fotocelda. Por último, dentro de la estructura metálica serán ubicadas verticalmente seis lámparas fluorescentes de luz diurna de 32 W, cada una separada entre sí para lograr el efecto “flash” (ilustración 3.1).

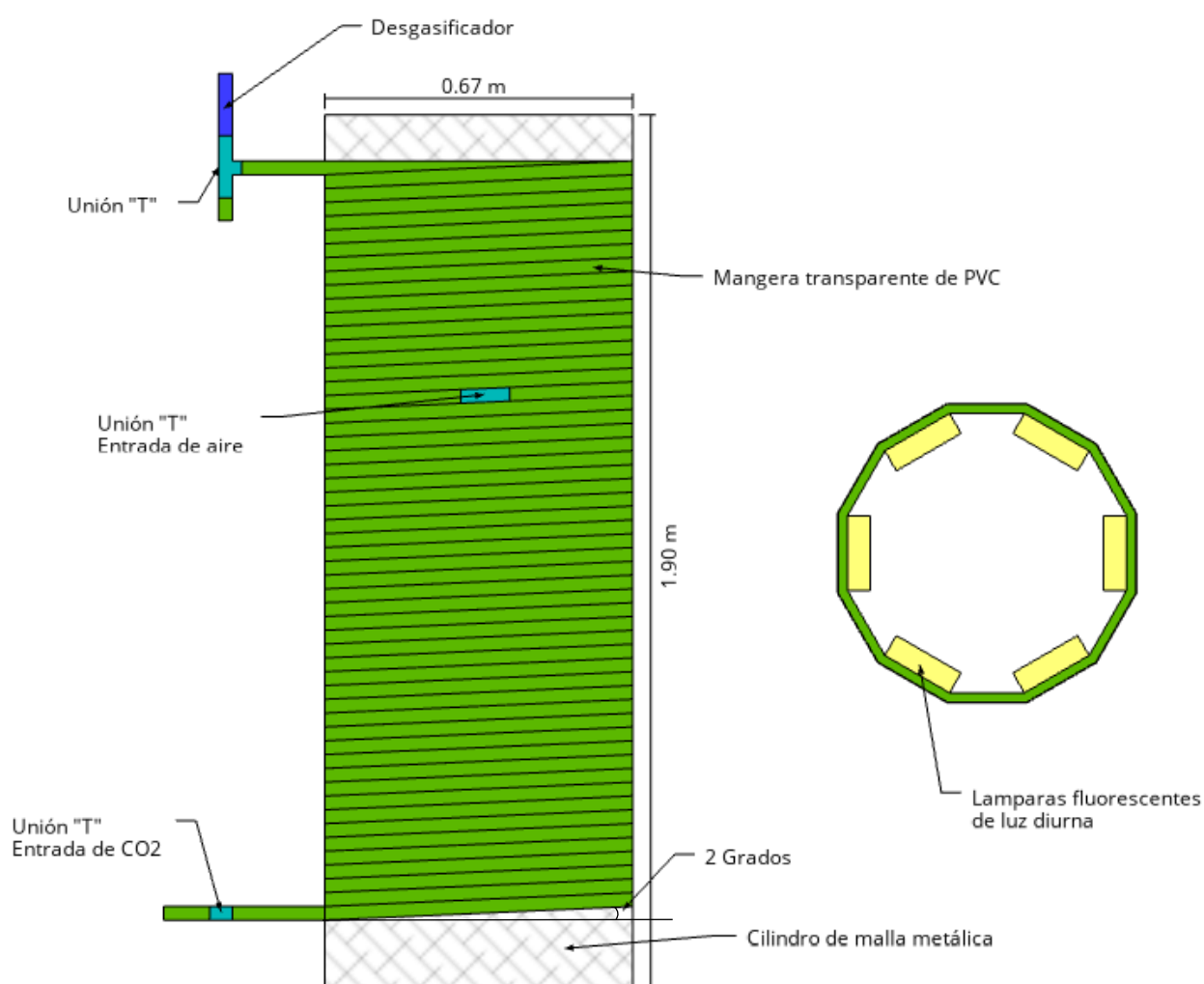


Ilustración 3.1 Diagrama esquemático de la fotocelda; Izquierda: vista frontal; Derecha: vista superior

3.3.2 Colector.

Un cilindro de 1.25 m de altura y 0.12 m de diámetro con un volumen de 15 L, donde se realizará la siembra y suplementación del medio del cultivo, estará equipado con una tubería en la parte inferior para la cosecha del cultivo, cobertura superior y sondas de pH, oxígeno disuelto y temperatura. Una vez en funcionamiento, el cultivo entrará al colector por gravedad y será transferido a la fotocelda por acción del “airlift” (ilustración 3.2).

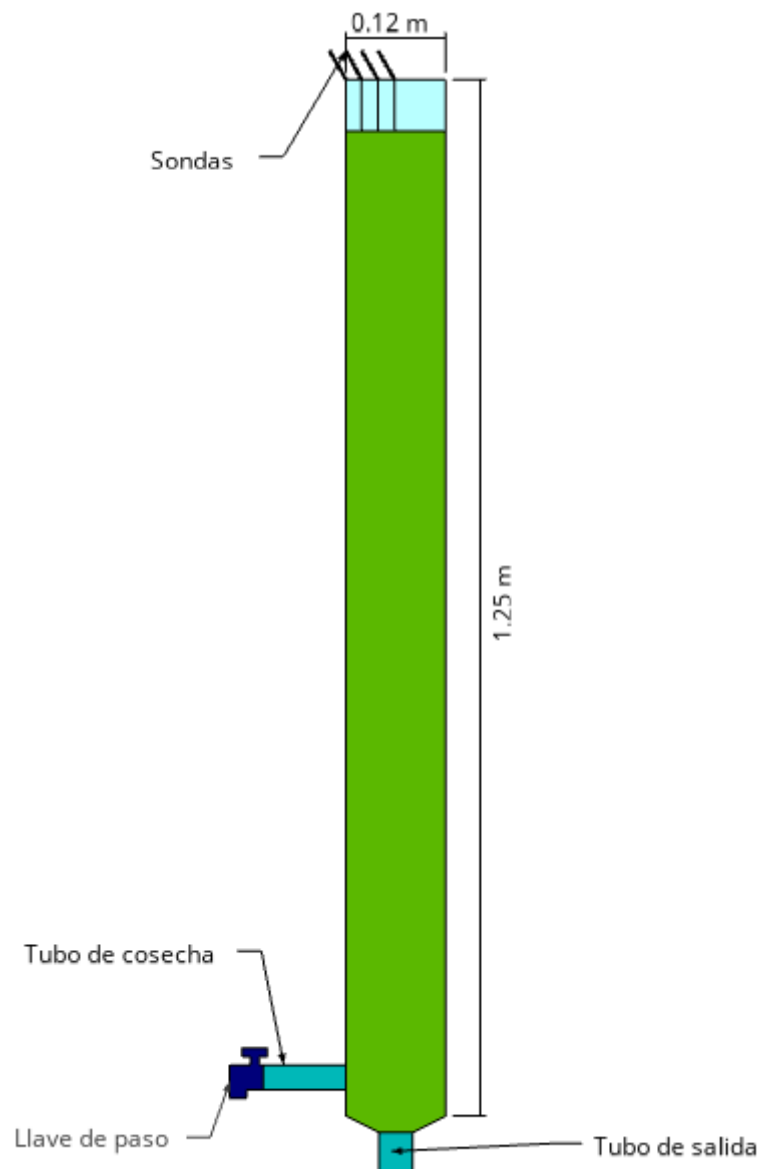


Ilustración 3.2 Diagrama esquemático del colector

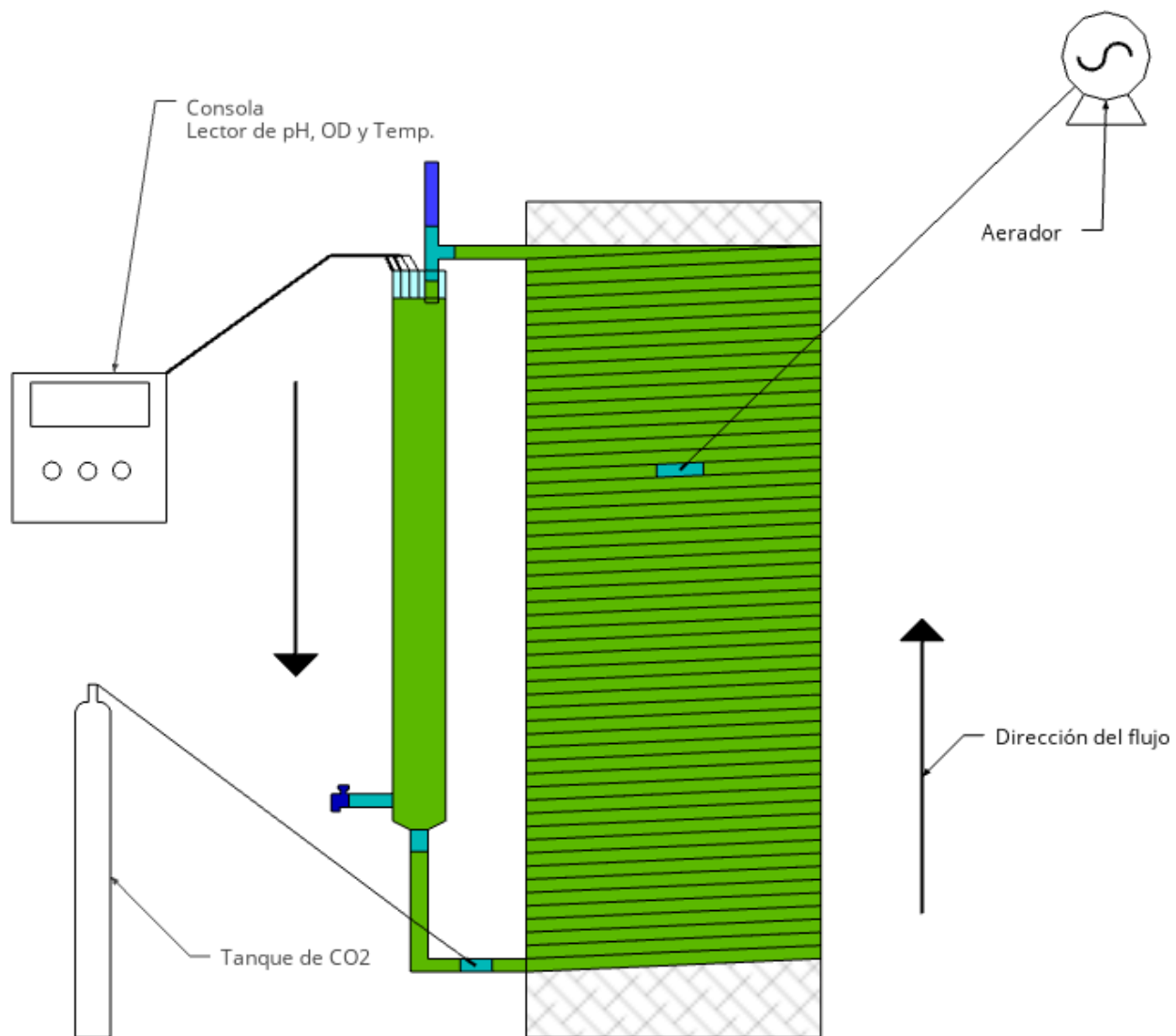


Ilustración 3.3 Diagrama esquemático del fotobiorreactor helicoidal de bajo costo

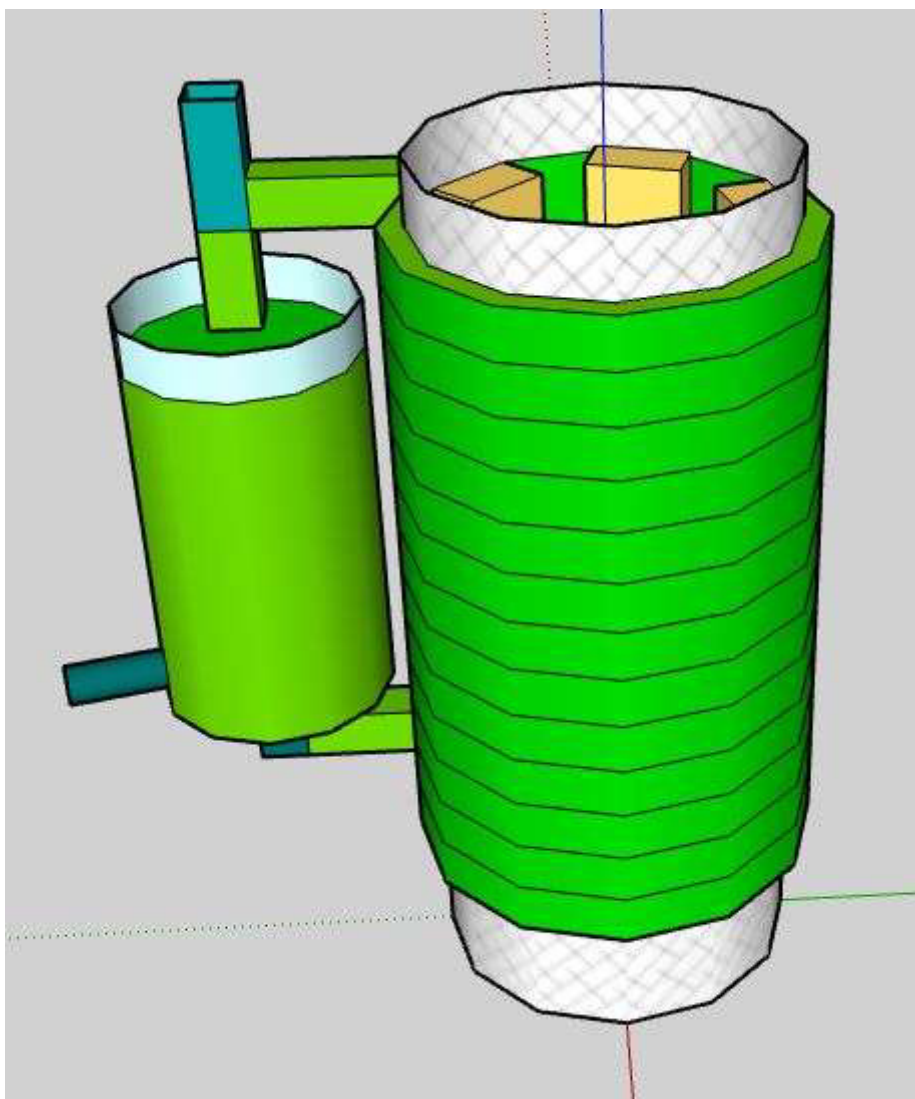


Ilustración 3.4 Modelo 3D del fotobiorreactor tubular helicoidal de bajo costo diseñado

3.3.3 Materiales y costo de implantación.

Materiales de bajo costo y dispositivos fundamentales fueron necesarios para el diseño del fotobiorreactor, la tabla 3.1 muestra los precios y los materiales necesarios para la construcción del fotobiorreactor. Dando como resultado un costo de instalación de \$4,458.10, siendo de menor costo que los fotobiorreactores comerciales de volúmenes similares cuyo valor varía entre 20,000 y 40,000 dólares. EL PBR-100L de CENAIM tuvo un costo de \$ 30,975.

Tabla 3.1 Materiales usados para el diseño del fotobiorreactor helicoidal de bajo costo, con sus respectivos precios en dólares

Material	Cantidad / Longitud	Precio (\$)
Manguera de PVC transparente	105 m	310.00
Unión "T" de PVC (1 pulg)	3	6.00
Multiparámetro YSI 5200® (Pentair)	1	3,500.00
Tubo de PVC (1 pulg)	0.1 m	0.10
Llave de paso (1 pulg)	1	2.00
Estructura metálica	1	10.00
Tanque colector	1	50.00
Tanque de CO ₂	1	265.00
Lámparas fluorescentes de luz diurna (32 W) y conexión eléctrica	6	315.00
	TOTAL	4,458.10

3.4 Funcionamiento del diseño de FBR propuesto

El FBR abarcará un área de 1.5 m² (1 m x 1.5 m) y volumen de 70L, entonces, para realizar la siembra serían necesario 6.4 L de microalgas y 64 L de medio enriquecido con Medio Guillard F/2, siguiendo a la relación estándar de repique en la fase de 10L a 100L del cultivo de microalgas usada en el centro 1:10 (microalgas – medio de cultivo). Luego, entraría en funcionamiento en conjunto: Las lámparas artificiales encendidas 24 horas al día; Multiparámetros, para el control de oxígeno disuelto (OD), pH y temperatura; Inyección de CO₂ mediante un suave burbujeo, regulado según las lecturas de pH; Inyección de aire, para la recirculación del cultivo a través de todo el sistema mediante "airlift"; Desgasificador, encargado de liberar el exceso de oxígeno gracias a permite el contacto con la atmosfera logrando la destrucción de las burbujas de aire y por consecuencia liberando el oxígeno del medio . Además, la temperatura del sistema será regulada por el ambiente (22-24°C).

Es importante mantener un exhaustivo control del crecimiento en los primeros cultivos, para poder elaborar la curva de crecimiento que permitirá determinar cuándo cosechar (en la fase de declive de crecimiento). Una vez cosechado el volumen requerido, se debe

reponer la misma cantidad de agua esterilizada y filtrada, más los nutrientes requeridos para alcanzar a mantener el crecimiento del cultivo.

La limpieza del FBR se realizará cada 56 días, haciendo circular por el sistema una solución de agua dulce e hipoclorito para neutralizarlo y luego, desarmar el sistema para realizar el autoclavado de las partes y, en caso de que se formen una biopelícula limpiarla haciendo uso de herramientas mecánicas o químicas (Lavens & Sorgeloos, 1996; Watanabe & Saiki, 1997).

3.5 Adecuamiento de las áreas de cultivo de microalgas para la integración del FBR en CENAIM

Se propone realizar cambios en las áreas C1, C2 y en los tanques exteriores del CENAIM (ilustración 2.1). Dentro del laboratorio C1 estarán ubicados los fotobiorreactores, que, al ocupar un área de 1,5 m² se puede disponer de 12 fotobiorreactores (ilustración 3.5). Por otro lado, el laboratorio C2 será adecuado para llevar a cabo un cultivo por "Batch" hasta 10 L, haciendo uso de recipientes transparentes. Además, los tanques exteriores deberán equiparse con iluminación artificial y mangueras difusoras (ilustración 3.6) para mantener la máxima densidad posible, ya que estos tanques recibirán las microalgas producidas por el fotobiorreactor.

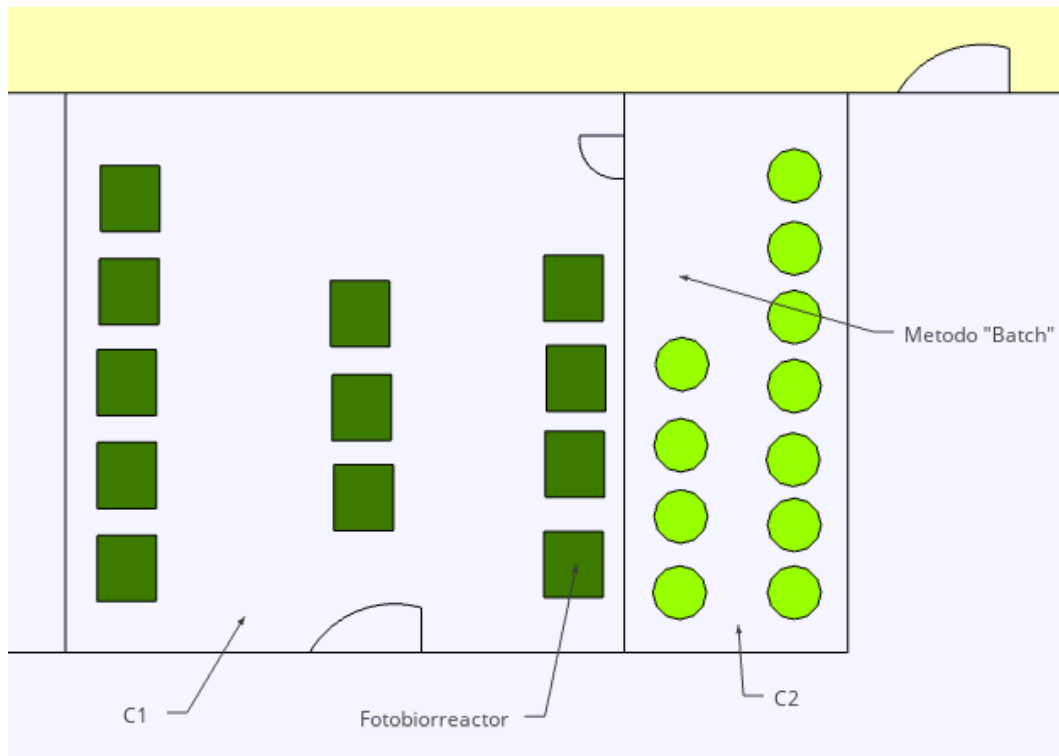


Ilustración 3.5 Ubicación espacial de los fotobiorreactores en el laboratorio C1 y recipientes de cultivo para el método “Batch” en el laboratorio C2.

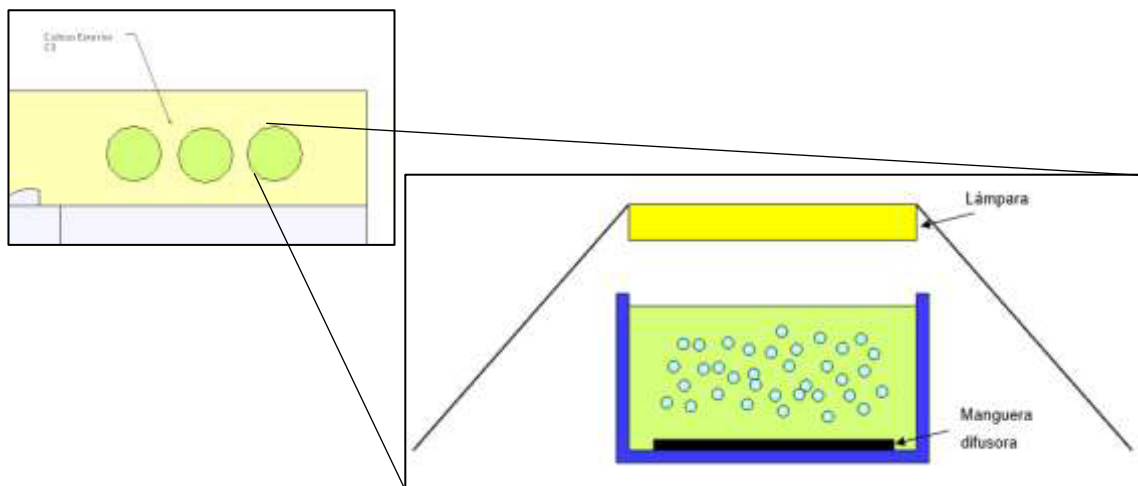


Ilustración 3.6 Diagrama de los tanques exteriores adecuados según las recomendaciones planteadas.

3.6 Proceso planteado para el cultivo intensivo de microalgas en CENAIM

A continuación, la ilustración 3.7 describe el proceso propuesto para realizar el cultivo intensivo de microalgas en CENAIM.

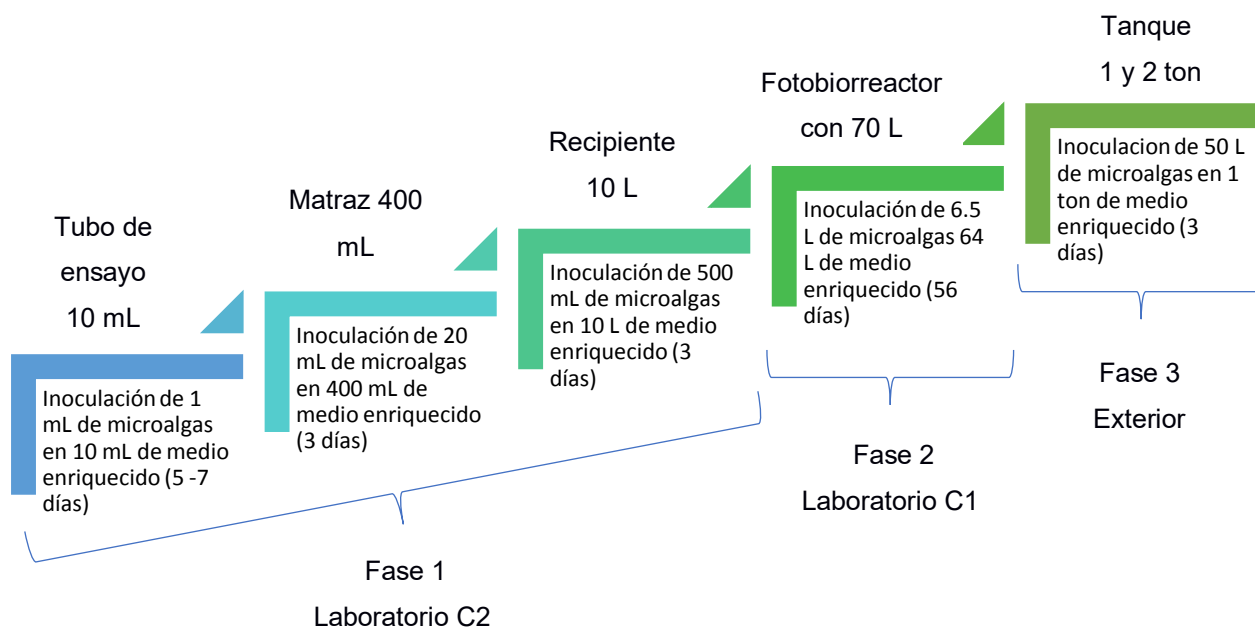


Ilustración 3.7 Proceso planteado para el cultivo intensivo de microalgas en CENAIM

La fase 1 del cultivo toma en promedio 12 días, sin embargo, no es necesario realizarla para cada cosecha, ya que, una vez sembrado el fotobiorreactor (Fase 2), este permitirá cosechas parciales cada 4 a 7 días (dependiendo de la curva de crecimiento obtenida). Así mismo, la fase 3 realizada en los tanques exteriores adecuados, se usarán en el caso de necesitar mayores cantidades de microalgas, ya sea para satisfacer una demanda de parte de las áreas de investigación del centro, o para la venta.

3.7 Productividad proyectada del cultivo intensivo de microalgas

Se procedió a comparar las cantidades obtenidas en una corrida de cultivo del método tradicional en contraste con las cantidades proyectadas del proceso de cultivo planteado (tabla 3.2). En este caso se comparó las producciones de la especie de microalga *Nannochloropsis sp.* y se utilizó el trabajo de Carvajal Oses et al. (2018) para proyectar las densidades de cosecha del FBR, ya que, el modelo utilizado para su estudio es similar al planteado.

Tabla 3.2 Cantidad de microalgas producidas en un área de 9m² usando el método “Batch” y FBR del CENAIM y proyección de producción para FBR tubular helicoidal de bajo costo diseñado.

Sistema / Método	Área de 9m ²	Densidades cosechadas (cel/mL)	Días de cultivo	Cantidad producida (cel)
Batch CENAIM	1 tanque de 2 ton	10*10 ⁶	20	20*10 ¹²
FBR CENAIM	4 FBR de 100 L	120*10 ⁶	18	48*10 ¹²
FBR diseñado	5 FBRs de 70 L	130*10 ⁶	18	45.5*10 ¹²

Como resultado de la comparación, se determinó que las cantidades producidas por el fotobiorreactor duplican a las del método por “Batch” del centro, sin embargo, son menores a las del FBR del CENAIM, pero, la diferencia que existe entre sus costos de implementación es significativa (\$26,516.90). Cabe mencionar que las cantidades del FBR diseñado no abarca las producciones en los tanques exteriores, como se ha planteado, ya que no se cuenta con fundamento teórico ni pruebas realizadas con las adecuaciones planteadas.

3.8 Costo operacional de producción

Se realizó el cálculo del costo para producir las cantidades de la tabla 3.2 para el método “Batch”, FBR del CENAIM y FBR propuesto; luego, se estableció el costo para producir 20*10¹² cel en cada sistema (tabla 3.3). Se utilizaron, de manera general, los costos de materiales, reactivos, equipos y personal, una descripción más detallada de los costos analizados se presenta en el apéndice D.

Tabla 3.3 Costos de producción de *Nannochloropsis sp.* en método “Batch”, FBR del CENAIM y FBR propuesto.

Sistema / Método	<i>Nannochloropsis sp.</i> # Cel	Costo de producción	Costo de producción (20*10 ¹² cel)
Batch CENAIM	20*10 ¹²	\$28.08	\$28.08
FBR CENAIM	48*10 ¹²	\$49.14	\$20.47
FBR diseñado	45.5*10 ¹²	\$46.53	\$ 20.45

Los resultados muestran que producir las cantidades de células descritas en la tabla 3.7.1, es más costoso en los fotobiorreactores. Pero, se realizó el cálculo del costo

estableciendo la cantidad de 20×10^{12} células en todos los sistemas, demostrando que los fotobiorreactores resultan menos costosos debido principalmente a la menor cantidad de horas hombre necesarias para su manejo y mantenimiento. En cuanto a la comparación entre los fotobiorreactores, no se nota diferencia significativa en cuanto a costo operacional, sin embargo, hay que tener en cuenta que, la diferencia del costo de implantación entre el FBR diseñado y FBR de CENAIM, es de \$26,516.90, siendo el FBR diseñado el de menor costo.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Se logró desarrollar un diseño de un fotobiorreactor tubular helicoidal de bajo costo, haciendo uso de materiales, en su mayoría baratos, y fáciles de conseguir, logrando disminuir notablemente el costo comparado al de un fotobiorreactor comercial PBR100L®. Además, se aprovecharon los recursos que el laboratorio C1 ofrece y se describió el funcionamiento del fotobiorreactor para asegurar el correcto manejo de este sistema y su posible implementación en el CENAIM.

Se planteó entonces una alternativa basada en la integración de fotobiorreactores tubulares helicoidales al método de cultivo del CENAIM, donde se distinguieron tres fases claves. La fase 1, donde el cultivo es llevado mediante el método “Batch” hasta un volumen de 10 L. Luego, la fase 2, donde las microalgas son sembradas en el fotobiorreactor donde permanecerán hasta 8 semanas, tiempo en el cual es llevado un cultivo semi-continuo donde se realizan cosechas parciales de hasta el 50% del cultivo cada 4 a 7 días. Por último, la fase 3, donde, en caso de necesitarse, se siembra microalgas cosechadas del fotobiorreactor en tanques exteriores adecuados.

Se estimó, mediante una comparación de la cantidad de microalgas que se espera produzca el fotobiorreactor contra las producidas en el CENAIM, que el fotobiorreactor puede duplicar la productividad del método tradicional del centro, gracias a las altas densidades que este sistema puede mantener debido al control de parámetros y la inocuidad que le ofrece al cultivo que, además, aumenta la calidad de las microalgas.

El diseño planteado presenta un 37% menos de costo operacional en comparación con el método batch. Por otro lado, el costo operacional en relación al FBR de CENAIM es prácticamente igual, sin embargo, el diseño planteado tiene costo de implantación 85.5% menor. Asegurando así, en caso de implementarse el diseño, una intensificación a bajo costo en el cultivo de microalgas.

4.2 Recomendaciones

Aplicar las mejoras planteadas al protocolo durante todas las fases de cultivo de la alternativa propuesta para la intensificación del cultivo de microalgas, con el fin de mejorar la inocuidad del cultivo y, por ende, la calidad y cantidad proyectada de

microalgas. Así, será posible abastecer la demanda por parte de todas las áreas del CENAIM.

Si se opta por aplicar la alternativa propuesta para la intensificación de microalgas en el CENAIM, se deberá, necesariamente, construir un primer modelo piloto basado en el diseño establecido y realizar pruebas de producción con varias especies de microalgas para asegurarse que las proyecciones realizadas en este trabajo fueron válidas. Estas pruebas permitirán realizar correcciones al diseño y, además, establecer las curvas de crecimientos de las microalgas de interés que permitirán una producción constante.

En caso de querer implementar el diseño del fotobiorreactor en otro laboratorio, se deberá hacer el análisis de los recursos e infraestructura que ese nuevo laboratorio brinda y adaptar el diseño a esas condiciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Ghosh, S., Fixler, D., Dubinsky, Z., & Iluz, D. (2016). Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresource Technology*, 203, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.057>
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2(2), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.004>
- Briassoulis, D., Panagakis, P., Chionidis, M., Tzenos, D., Lalos, A., Tsinos, C., ... Jacobsen, A. (2010a). An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 101, 6768–6777. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.103>
- Briassoulis, D., Panagakis, P., Chionidis, M., Tzenos, D., Lalos, A., Tsinos, C., ... Jacobsen, A. (2010b). Bioresource Technology An experimental helical-tubular photobioreactor for continuous production of *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 101(17), 6768–6777. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.103>
- Brown, M. R., & Blackburn, S. I. (2013). *Live microalgae as feeds in aquaculture hatcheries. Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.1.117>
- Burlew, J. (1953). *Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant*. Washington: Carnegie Institution of Washington. <https://doi.org/10.3998/3336451.0014.102.Electronic>
- Carvajal Oses, M., Chacón Guzmán, J., & Herrera Ulloa, Á. (2018). Optimization in the production of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in a helical tubular photobioreactor. *Tecnología En Marcha*, (June). <https://doi.org/10.18845/tm.v31i2.3629>
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, 332–344. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>
- Conceição, L. E. C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., & Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41(5), 613–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x>
- Del Campo, J. A., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. *Applied*

Microbiology and Biotechnology, 74(6), 1163–1174. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>

FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018*. Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/publications/es>

García, F., Contreras, A., Fernández, J., Acién, G., & Molina, E. (1999). Use of concentric-tube airlift photobioreactors for microalgal outdoor mass cultures, 0229(98), 164–172.

Goldman, J. C., Azov, Y., Riley, C. B., & Dennett, M. R. (1982). The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 57(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(82\)90140-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90140-X)

İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70(April), 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007>

Kim, W., Park, J. M., Gim, G. H., Jeong, S. H., Kang, C. M., Kim, D. J., & Kim, S. W. (2012). Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1–2), 19–27. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0612-1>

Klinthong, W., Yang, Y. H., Huang, C. H., & Tan, C. S. (2015). A Review: Microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy. *Aerosol and Air Quality Research*, 15(2), 712–742. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2014.11.0299>

Knuckey, R. M., Brown, M. R., Robert, R., & Frampton, D. M. F. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35(3), 300–313. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2006.04.001>

Lavens, P., & Sorgeloos, P. (1996). *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Rome: FAO.

Lee, Y. K. (2001). Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, 13(4), 307–315. <https://doi.org/10.1023/A:1017560006941>

Lombardi, A. T., & Wangersky, P. J. (1995). Particulate lipid class composition of three marine phytoplankters *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* (Tahiti) and *Dunaliella tertiolecta* grown in batch culture, 1–6.

- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Moheimani, N. R. (2013). Long-term outdoor growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) in bag photobioreactors, 1, 167–176. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9850-0>
- Muller-feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12(1998), 527–534. <https://doi.org/10.1023/A:1008106304417>
- Neil, P., Gail, H., Janet, H., Robert, H., Pascale, N., Brian, P., & Francois, M. (2017). Preparation and Chemistry of the Artificial Algal Culture Medium Aquil. *Biological Oceanography*, 6(August 2014), 443–461. <https://doi.org/10.1080/01965581.1988.10749544>
- Nitin Thukral, M. S. (2015). Microalgae as Future Fuel: Real Opportunities and Challenges. *Journal of Thermodynamics and Catalysis*, 06(01), 1–11. <https://doi.org/10.4172/2157-7544.1000139>
- Onumaegbu, C., Mooney, J., Alaswad, A., & Olabi, A. G. (2018). Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 93(April), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.015>
- Ottinger, M., Clauss, K., & Kuenzer, C. (2016). Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments - A review. *Ocean and Coastal Management*, 119, 244–266. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2015.10.015>
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., & Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1429–1441. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3170-1>
- Papandroulakis, N., Divanach, P., Anastasiadis, P., & Kentouri, M. (2001). The pseudo-green water technique for intensive rearing of sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture International*, 9(3), 205–216. <https://doi.org/10.1023/A:1016813623122>
- Quader, M. A., & Ahmed, S. (2017). *Bioenergy With Carbon Capture and Storage (BECCS): Future Prospects of Carbon-Negative Technologies. Clean Energy for Sustainable Development*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805423-9.00004-1>

- Raes, E. J., Isdepsky, A., & Muylaert, K. (2013). Comparison of growth of *Tetraselmis* in a tubular photobioreactor (Biocoil) and a raceway pond. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0077-5>
- Razzak, S. A., Ali, S. A. M., Hossain, M. M., & DeLasa, H. (2017). Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76(September 2015), 379–390. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.038>
- Renaud, S. M., Thinh, L.-V., & Parry, D. L. (1998). The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 9 Suppl 1, 147–159. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00399-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00399-8)
- Renaud, S. M., Thinh, L., Lambrinidis, G., & Parry, D. L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211, 195–214. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00875-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00875-4)
- Richmond, A., & Hu, Q. (2013). *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology* (Second). Wiley Blackwell.
- Ritcharoen, W., Sriouam, P., Nakseedee, P., Sang, P., Kungvansaichol, K., & Pavasant, P. (2014). Cultivation options for indoor and outdoor growth of *Chaetoceros gracilis* with airlift photobioreactors. *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, 8(01), 100–113. <https://doi.org/10.14456/mijst.2014.9>
- Roleda, M. Y., Slocombe, S. P., Leahey, R. J. G., Day, J. G., Bell, E. M., & Stanley, M. S. (2013). Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology*, 129, 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.043>
- Ruangsomboon, S. (2012). Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. *Bioresource Technology*, 109, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.025>
- Shi, X. M., Jiang, Y., & Chen, F. (2002). High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnology Progress*, 18(4), 723–727. <https://doi.org/10.1021/bp0101987>

- Singh, R. N., & Sharma, S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2347–2353. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>
- Subba Rao, D. (2006). *Algal Cultures, Analogues of Blooms and Applications*. Bedford Institute of Oceanography (Vol. 1). Canada.
- Takagi, M., Karseno, & Yoshida, T. (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(3), 223–226. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.223>
- Travieso, L., Hall, D. O., Rao, K. K., Benã, F., & Sã, E. (2001). A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode, 47, 151–155.
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10), 4021–4028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>
- Wang, B., Lan, C. Q., & Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, 30(4), 904–912. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.019>
- Watanabe, Y., & Saiki, H. (1997). Development of a photobioreactor incorporating *Chlorella* sp. for removal of CO₂ in stack gas. *Elsevier Science*, 38(96), 499–503.
- Xu, L., Weathers, P. J., Xiong, X. R., & Liu, C. Z. (2009). Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 178–189. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800111>
- Xu, Z., Baicheng, Z., Yiping, Z., Zhaoling, C., Wei, C., & Fan, O. (2002). A simple and low-cost airlift photobioreactor for microalgal mass culture, 1767–1771.
- Zhang, C. W., & Richmond, A. (2003). Sustainable, high-yielding outdoor mass cultures of *Chaetoceros muelleri* var. *subsalsum* and *Isochrysis galbana* in vertical plate reactors. *Marine Biotechnology*, 5(3), 302–310. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0075-0>

APÉNDICES

APÉNDICE A

Preguntas realizadas a la encargada del laboratorio de fitoplancton de CENAIM.

- ¿Tiene un problema para satisfacer la demanda de fitoplancton que le pide CENAIM?
- ¿Cuáles son los causantes del problema?
- ¿Qué especies de fitoplancton tienen y cuáles son las más utilizadas en CENAIM?
- ¿Como es el proceso de cultivo tradicional en CENAIM?
- ¿Cuál es volumen y densidad máxima que se puede lograr en el cultivo tradicional?
- En promedio, ¿Qué especies y cuánto volumen de fitoplancton es solicitado por las distintas áreas del CENAIM?
- ¿El cultivo tradicional afecta a la calidad del fitoplancton?
- ¿Existe algún tipo de contaminación en el cultivo?
- ¿Cuál es el agente contaminante más común?
- ¿Cuáles son los esfuerzos que se han hecho para intentar solucionar el problema?

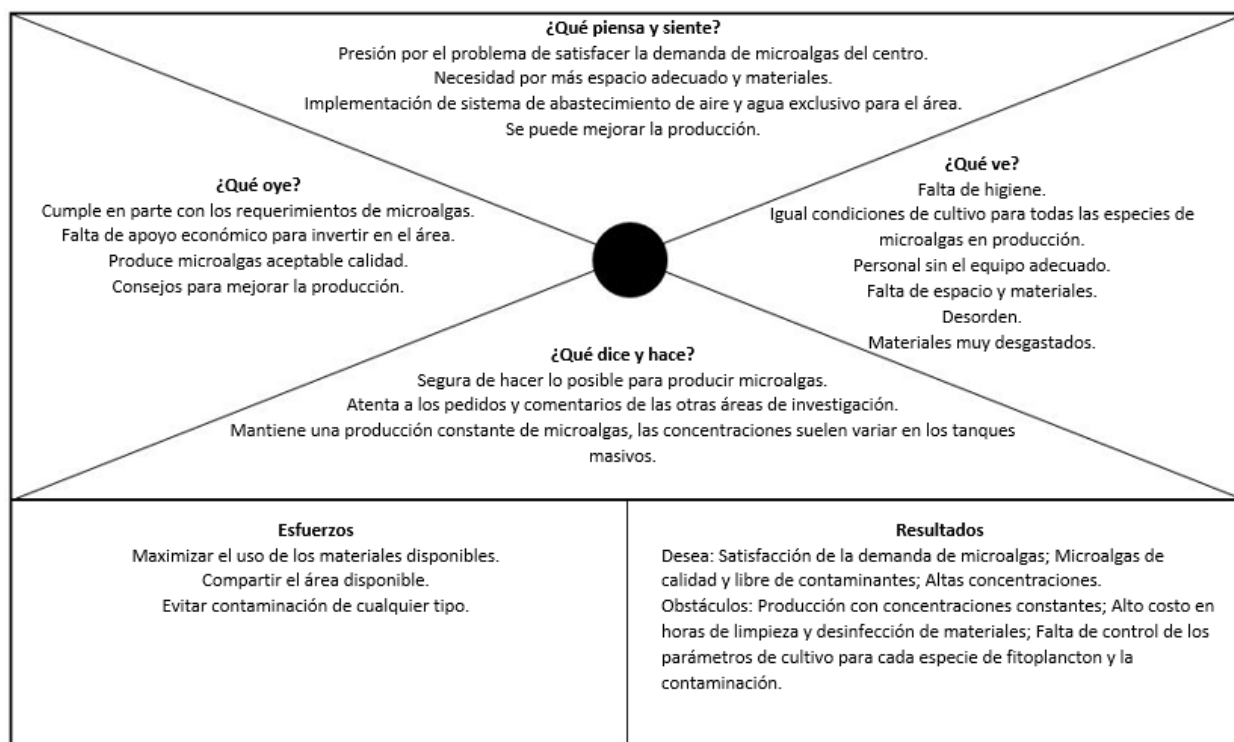
APÉNDICE B

Preguntas realizadas a los encargados de las áreas de investigación del CENAIM (Peces marinos, moluscos, equinodermos y zooplancton).

- ¿Qué especies de fitoplancton usan?
- ¿Es satisfactoria la densidad en que el fitoplancton es entregado?
- ¿Cuál es el volumen de fitoplancton requerido?
- ¿Considera que la calidad del fitoplancton es buena?
- ¿Han notado algún agente contaminante en el fitoplancton entregado?
- ¿Se ha generado algún problema a causa del fitoplancton?

APÉNDICE C

Mapa de empatía basado en la entrevista de la encargada del área de fitoplancton, Lcda. Doris Reyes.



APÉNDICE D

Detalle para el cálculo del costo operacional en el método “Batch” (1); FBR de CENAIM (2); FBR diseñado (3).

1

MATERIALES DESCARTABLES	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Papel toalla (m)	0.5	\$0.07
Papel aluminio (m)	0.25	\$0.08
SUBTOTAL		\$0.15

REACTIVOS	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Solución de Fitobloom 2 (ml)	125.00	\$0.07
Solucion 2 en grado técnico concentrada (ml)	125.00	\$0.02
Tiosulfato de sodio grado técnico gr	15.60	\$0.25
Otolidine ml	0.20	\$0.02
Lugol ml	0.01	\$0.00
Hipoclorito de sodio ml	30.00	\$0.08
Ácido clorhídrico ml	10.00	\$0.07
Alcohol industrial ml	1.00	\$0.00

Jabón neutro ml	0.02	\$0.00
Agua de mar (litros)	1000.00	\$0.00
Agua destilada para autoclave litros	2.00	\$0.25
Agua destilada para fertilizantes ml	280.00	\$0.07
SUBTOTAL		\$0.82

MATERIAL DE VIDRIO	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Cámara Neubauer	1	\$0.07
Botellas vidrio tapa rosca de 1L	5	\$0.00
micropipeta pasteur 2 ml	1	\$0.00
Probeta plástica de 250 ml	1	\$0.00
Beaker plástico de 2 litros	1	\$0.01
Tanque plástico de 2 toneladas	1	\$0.04
Picetas plásticas de 500 ml	1	\$0.00
Manguera plástica 3/4	1	\$0.08
Manguera plástica 3/16	1	\$0.02
Adaptadores Y para aire	1	\$0.00
Válvula para aire 3/16	1	\$0.00
Válvula de bola universal 3/4	2	\$0.00
Tubería de PVC de 3/4	2	\$0.00
Barra magnética	1	\$0.00
Lustres	1	\$0.01
SUBTOTAL		\$0.24

EQUIPOS	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Microscopio	2 minutos	\$0.02
Autoclave	2 horas	\$2.99
Agitador	15 minutos	\$0.02
Balanza digital	10 minutos	\$0.07
Bomba sumergible	2 horas	\$1.01
SUBTOTAL		\$4.11

PERSONAL	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Auxiliar Técnico de laboratorio	2 horas	\$11.74
Analista de laboratorio de investigación 2	30 minutos por el análisis de una muestra	\$8.47
SUBTOTAL		\$20.21

COSTO DEL ANALISIS	% INCREMENTO	
MATERIALES DESCARTABLES		\$0.15
REACTIVOS		\$0.82
MATERIAL DE VIDRIO		\$0.24
EQUIPOS		\$4.11
PERSONAL		\$20.21
SUBTOTAL		\$25.53
INDIRECTOS (elect, agua, secret, tele)	10%	\$2.55
COSTO TOTAL		\$28.08

2

MATERIALES DESCARTABLES	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Papel toalla (m)	0.5	\$0.08
Papel aluminio (m)	0.3	\$0.08
SUBTOTAL		\$0.16

REACTIVOS	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Fertilizante GUILLARD F/2 (L)	12.00	\$0.80
Tiosulfato de sodio grado técnico gr	15.60	\$0.13
Otolidine ml	0.20	\$0.01
Lugol ml	0.01	\$0.00
Hipoclorito de sodio ml	30.00	\$0.04
Ácido clorhídrico ml	10.00	\$0.03
Alcohol industrial ml	1.00	\$0.00
Jabón neutro ml	0.02	\$0.00
Agua de mar (litros)	100.00	\$0.00
Agua destilada para autoclave litros	2.00	\$0.25
Agua destilada para fertilizantes (L)	20.00	\$0.01
SUBTOTAL		\$1.27

MATERIAL DE VIDRIO	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Cámara Neubauer	1	\$0.07
Botellas vidrio tapa rosca de 1L	5	\$0.00
Micropipeta pasteur 2 ml	1	\$0.00
Probeta plástica de 250 ml	1	\$0.00
Beaker plástico de 2 litros	2	\$0.01
Picetas plásticas de 500 ml	1	\$0.00
Adaptadores Y para aire	1	\$0.00
Válvula de bola universal 3/4	2	\$0.00
Recipientes plasticos de 10 L	2	\$0.03

Barra magnética	1	\$0.00
Lustres	1	\$0.01
SUBTOTAL		\$0.13

EQUIPOS	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Microscopio	2 minutos	\$0.02
Autoclave	2 horas	\$2.00
Agitador	15 minutos	\$0.02
Balanza digital	10 minutos	\$0.04
SUBTOTAL		\$2.08

PERSONAL	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Auxiliar Técnico de laboratorio	2 horas	\$2.80
Analista de laboratorio de investigación 2	30 minutos por el análisis de una muestra	\$4.24
SUBTOTAL		\$7.04

COSTO DEL ANALISIS	% INCREMENTO	
MATERIALES DESCARTABLES		\$0.16
REACTIVOS		\$1.27
MATERIAL DE VIDRIO		\$0.13
EQUIPOS		\$2.08
PERSONAL		\$7.04
SUBTOTAL		\$10.68
INDIRECTOS (elect, agua, secret, tele)	15%	\$1.60
COSTO TOTAL		\$12.29
COSTO TOTAL * 4 FBR		\$49.14

3

MATERIALES DESCARTABLES	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Papel toalla (m)	0.3	\$0.04
Papel aluminio (m)	0.2	\$0.04
SUBTOTAL		\$0.08

REACTIVOS	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Fertilizante GUILLARD F/2 (L)	10.00	\$0.50
Tiosulfato de sodio grado técnico gr	15.60	\$0.13

Otolidine ml	0.20	\$0.01
Lugol ml	0.01	\$0.00
Hipoclorito de sodio ml	30.00	\$0.04
Ácido clorhídrico ml	8.00	\$0.02
Alcohol industrial ml	1.00	\$0.00
Jabón neutro ml	0.02	\$0.00
Agua de mar (litros)	70.00	\$0.00
Agua destilada para autoclave litros	2.00	\$0.25
Agua destilada para fertilizantes (L)	18.00	\$0.01
SUBTOTAL		\$0.96

MATERIAL DE VIDRIO	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Cámara Neubauer	1	\$0.07
Botellas vidrio tapa rosca de 1L	5	\$0.00
micropipeta pasteur 2 ml	1	\$0.00
Probeta plástica de 250 ml	1	\$0.00
Beaker plástico de 2 litros	2	\$0.01
Picetas plásticas de 500 ml	1	\$0.00
Adaptadores Y para aire	1	\$0.00
Válvula de bola universal 3/4	2	\$0.00
Recipientes plasticos de 10 L	1	\$0.01
Barra magnética	1	\$0.00
Lustres	1	\$0.01
SUBTOTAL		\$0.11

EQUIPOS	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Microscopio	2 minutos	\$0.02
Autoclave	1 horas	\$1.30
Agitador	10 minutos	\$0.01
Balanza digital	10 minutos	\$0.04
SUBTOTAL		\$1.37

PERSONAL	CANTIDAD UTILIZADA	COSTO
Auxiliar Técnico de laboratorio	1 horas	\$1.70
Analista de laboratorio de investigación 2	30 minutos por el análisis de una muestra	\$4.24
SUBTOTAL		\$5.94

COSTO DEL ANALISIS	% INCREMENTO	
MATERIALES DESCARTABLES		\$0.08
REACTIVOS		\$0.96
MATERIAL DE VIDRIO		\$0.11
EQUIPOS		\$1.37
PERSONAL		\$5.94
SUBTOTAL		\$8.46
INDIRECTOS (elect, agua, secret, tele)	10%	\$0.85
COSTO TOTAL		\$9.31
COSTO TOTAL * 5 FBR		\$46.53