

## Evaluación de la producción de biomasa utilizando *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente

Ana Cristina Montúfar Mayorga, Luis Ernesto Núñez González y Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano

Centro de Procesos Industriales y Departamento de Ingeniería en Biotecnología Industrial, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 2023

**RESUMEN:** Las microalgas, incluyendo la especie *Nannochloropsis oculata*, pueden ser una fuente importante de biomasa para diversas aplicaciones. Esto incluye la obtención de proteínas o biomoléculas empleadas en la industria de alimentos; extracción de clorofila y otros metabolitos como componentes de suplementos vitamínicos, o simplemente como fuente de energía térmica. En este estudio se evaluó el crecimiento celular de las microalgas *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente, para determinar los parámetros experimentales que generan los mejores rendimientos; así como la propuesta de un modelo cinético para predecir el comportamiento de las especies de la mezcla, bajo los distintos parámetros experimentales. Se obtuvo que la concentración inicial de la fuente de nitrógeno  $\times 1.00$  (0.300 g  $\text{NaNO}_3/\text{L}$ ) permite obtener la mayor producción de biomasa, siendo esta de  $12.5005 \text{ g} \pm 0.0193 \text{ g}$ . Sin embargo, la concentración inicial de la fuente de nitrógeno  $\times 0.10$  (0.030 g  $\text{NaNO}_3/\text{L}$ ) permite obtener el mayor rendimiento de biomasa, el cual es de  $72.4731 \text{ g biomasa/g NO}_3$ . Asimismo, se desarrolló y parametrizó un modelo cinético, basado en el modelo de Monod, para describir el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* y su respectivo consumo del sustrato limitante, el cual es el nitrato, a distintas concentraciones iniciales de dicha fuente de nitrógeno, cuyos parámetros reflejan valores propios de un crecimiento limitado por la absorción de energía radiante.

**PALABRAS CLAVE:** microalgas, fotobiorreactor, biomasa, nitrato, modelo cinético, Monod.

### Evaluation of biomass production using *Nannochloropsis oculata* in a rising bubble column photobioreactor

**ABSTRACT:** Microalgae, including the species *Nannochloropsis oculata*, can be an important source of biomass for various applications. This includes obtaining proteins or biomolecules used in the food industry, extracting chlorophyll and other metabolites as components of vitamin supplements, or simply as a source of thermal energy. With such potential in mind, this study evaluated the cellular growth of *Nannochloropsis oculata* microalgae in an upflow bubble column photobioreactor to determine the experimental parameters that yield the best results. Additionally, a kinetic model was proposed to predict the behavior of the species in the mixture under different experimental conditions. It was found that an initial concentration of nitrogen source  $\times 1.00$  (0.300 g  $\text{NaNO}_3/\text{L}$ ) allows for the highest biomass production, reaching  $12.5005 \text{ g} \pm 0.0193 \text{ g}$ . However, an initial concentration of nitrogen source  $\times 0.10$  (0.030 g  $\text{NaNO}_3/\text{L}$ ) leads to the highest biomass yield, which is  $72.4731 \text{ g biomass/g NO}_3$ . Furthermore, a kinetic model based on the Monod model was developed and parameterized to describe the cellular growth of *N. oculata* microalgae and its corresponding consumption of the limiting substrate: nitrate, at different initial concentrations of this nitrogen source. The parameters reflect values typical of growth limited by the absorption of radiant energy.

**KEYWORDS:** microalgae, photobioreactor, biomass, nitrate, kinetic model, Monod.

## Introducción

Debido a la actual crisis climática y a la sobrepoblación mundial, se han desarrollado investigaciones para encontrar nuevas formas de producir los bienes necesarios para la humanidad, como fuentes de energía y alimento. Las microalgas, como la especie *Nannochloropsis oculata*, pueden llegar a considerarse como una fuente importante de biomasa. Esta biomasa puede aprovecharse para la obtención de proteínas como fuente de alimento; clorofila y otros metabolitos secundarios como fuente de suplementos vitamínicos y de medicinas; pigmentos para la industria textil y alimentaria; así como lípidos como materia prima para la producción de biocombustibles (Ganesan *et al.*, 2020). Por ende, la comunidad científica ha enfocado sus esfuerzos en maximizar la producción de biomasa de microalgas y para lograr escalar el proceso de una forma eficiente y sostenible. Actualmente países como Japón, España y Cuba ya están desarrollando las tecnologías para llevar a una escala industrial el crecimiento de microalgas para la obtención de productos con potencial en agricultura, nutrición, cosmética y la creación de biocombustibles (Moreno *et al.*, 2016). Sin embargo, en Guatemala aún se están desarrollando investigaciones en esta rama, por lo que no se cuenta con tecnologías desarrolladas para la producción industrial de microalgas.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, es decir que aprovechan la luz solar para producir energía química para su metabolismo y tienen la capacidad de fijar el dióxido de carbono (Chisti, 2007). Una de las especies más utilizadas en la industria, debido a su alto valor nutricional y su tolerancia a los cambios ambientales, es *Nannochloropsis oculata*. Sin embargo, la producción de biomasa depende en gran medida de las condiciones ambientales, así como del tipo de biorreactor en el que está siendo cultivada la microalga. Los factores con más impacto en dicha producción son: la disponibilidad de nutrientes en el medio, en especial la deficiencia de nitrógeno, salinidad, fuente e intensidad de luz, pH, temperatura y niveles de oxígeno disuelto (Bi & He, 2020).

Una de las formas que se utilizan para cultivar a las microalgas *N. oculata* es mediante un fotobiorreactor de columna. Dichos fotobiorreactores están hechos en forma de columna vertical y con materiales como vidrio transparente o acrílico. Cuentan con un sistema de burbujeo de aire en la parte inferior, lo cual crea turbulencia para mezclar adecuadamente el medio de cultivo y lograr la transferencia de masa de dióxido de carbono y oxígeno producido. Asimismo, las fuentes de luz pueden ser instaladas interna o externamente para proveer una mejor distribución de luz. Las principales ventajas de dichos reactores es que permiten una alta transferencia de masa, una baja fotoinhibición y fotooxidación, las condiciones

de cultivo son altamente controlables, se obtienen altos rendimientos de biomasa, las columnas son compactas, fáciles de mantener y de bajo costo energético. Por ende, este tipo de reactores cuentan con una alta escalabilidad para la industria (Eriksen, 2008; Alami *et al.*, 2020).

También es importante conocer y analizar la cinética del crecimiento celular de las microalgas en las condiciones experimentales dentro de los fotobiorreactores de columna ascendente. La cinética puede obtenerse al medir con el paso del tiempo la concentración celular, la concentración del sustrato limitante y, de ser posible, la concentración del producto de interés. El análisis permitirá obtener la tasa de crecimiento celular, entre otros parámetros cinéticos importantes, como la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el espacio-tiempo ( $\tau$ ). Con ayuda de los parámetros se puede predecir el crecimiento celular de las microalgas bajo distintas condiciones experimentales. Todo esto resulta útil para el escalamiento de los fotobiorreactores, puesto que el tiempo de reacción debe permanecer constante en la nueva escala y se puede producir microalgas bajo las condiciones que generen los mejores rendimientos.

Específicamente, el modelo de Monod se utiliza ampliamente para expresar el efecto que tiene la concentración del sustrato limitante sobre la velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ). Se caracteriza por expresar cómo la velocidad de crecimiento específico aumenta con la concentración del sustrato limitante. Su expresión empírica está basada en la forma de ecuación que normalmente se asocia a la cinética enzimática (Lee, 2009). El modelo de Monod se expresa como la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_S}{K_S + C_S}$$

(Ecuación 1)

En donde  $\mu_{\max}$  es la velocidad máxima específica de crecimiento,  $C_S$  es la concentración del sustrato limitante en el medio de cultivo y  $K_S$  es un parámetro constante que expresa la afinidad al sustrato limitante. El valor de  $K_S$  es igual a la concentración del sustrato limitante cuando la velocidad específica de crecimiento cuenta con un valor igual a la mitad de su máximo valor (Lee, 2009). Cabe resaltar que el modelo de Monod es una simplificación del complicado mecanismo del crecimiento celular como resultado de todas las reacciones bioquímicas que conforman el metabolismo celular. Por ende, describe adecuadamente la cinética de las fermentaciones microbianas cuando las concentraciones de los inhibidores en el medio son bajas y se asume que las variables del sistema se mantienen constantes en el tiempo. Además, de acuerdo con la expresión del modelo, un

incremento en la concentración del sustrato una vez que  $\mu$  alcanza el valor de  $\mu_{max}$  no afectará la velocidad de crecimiento específica, por lo que el valor de esta variable tenderá a ser constante (Lee, 2009).

Un ejemplo de la aplicación del modelo de Monod se refleja en el estudio de Gharagozloo y colaboradores, 2014, donde se analizó y modeló el crecimiento de *Nannochloropsis salina* en laboratorio, invernadero y en reactores tipo raceway. Para el modelo del crecimiento celular se consideró la influencia de la disponibilidad de nutrientes en el medio, por lo que se utilizó el modelo de Monod, el cual se expresó como la siguiente ecuación:

$$f(\nu) = \frac{\nu}{K_x^h + \nu} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

En donde  $f(\nu)$  es la velocidad específica de crecimiento,  $\nu$  es la concentración de nutrientes y  $K_x^h$  es la constante de afinidad al sustrato. En dicho estudio se expone que el crecimiento de las microalgas analizadas se modeló bajo una concentración limitada de los siguiente nutrientes: amonio disuelto ( $\text{NH}_4$ ), nitrato ( $\text{NO}_3$ ), fosfato ( $\text{PO}_4$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Por lo que la velocidad específica de crecimiento se modeló con la siguiente ecuación:

$$f(\nu) = \min\left(\frac{\text{NH}_4 + \text{NO}_3}{K_N^h + \text{NH}_4 + \text{NO}_3}, \frac{\text{PO}_4}{K_P^h + \text{PO}_4}, \frac{\text{CO}_2}{K_C^h + \text{CO}_2}\right) \quad \text{(Ecuación 3)}$$

En donde  $K_N^h$ ,  $K_P^h$  y  $K_C^h$  son las constantes de afinidad al  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$  y  $\text{CO}_2$ , respectivamente. Cabe agregar que los resultados de dicho estudio revelan que el modelo predice

el crecimiento de las microalgas analizadas en sistemas con una escala variable e identifica las causas que provocan una reducción en la productividad de biomasa.

A pesar de todo este conocimiento, en Guatemala aún no se cuentan con estudios para entender qué condiciones generan la mayor producción de biomasa de microalgas, para hacer que la producción industrial de biomasa sea eficiente y puede aprovecharse en su totalidad. De acuerdo a lo mencionado, en el presente trabajo se presenta la evaluación del crecimiento celular de las microalgas *Nannochloropsis oculata* en un fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente, para determinar los parámetros experimentales que generan los mejores rendimientos; así como la propuesta de un modelo cinético para predecir su comportamiento bajo los distintos parámetros experimentales.

## Metodología

### Preparación del medio de cultivo Guillard f/2 modificado

Se prepararon 5 litros del medio Guillard f/2, enriquecido con los nutrientes esenciales y a las concentraciones necesarias para preparar un total de 45 litros del medio de cultivo de microalgas. Este proceso incluyó la adición de 43.35 mL de la solución de fosfato dipotásico, 45 mL de la solución de trazas de metal y 4888.2 mL de agua destilada. El medio resultante fue esterilizado en autoclave y luego se incorporaron 22.5 mL de la solución vitamínica a través de un filtro de 2  $\mu\text{m}$ . La composición del medio sigue la formulación establecida por Guillard en 1975, la cual se presenta en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Resumen de los nutrientes utilizados para el medio f/2 Guillard desde tres miradas diferentes.

Nutriente	Solución Stock recomendada (g/L)	Concentración molar en el medio final (M)	Peso molecular (g/mol)	Solución
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5.0	$3.62 \times 10^{-5}$	136.09	N/A
$\text{FeCl}_3$	N/A	$1.17 \times 10^{-5}$	162.22	Trazas de metal
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	N/A	$1.17 \times 10^{-5}$	336.21	Trazas de metal
$\text{CuSO}_4$	9.8	$3.93 \times 10^{-8}$	159.61	Trazas de metal
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22.0	$7.65 \times 10^{-8}$	287.54	Trazas de metal
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0	$4.20 \times 10^{-8}$	237.93	Trazas de metal
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	180.0	$9.10 \times 10^{-7}$	197.91	Trazas de metal
Tiamina HCl	N/A	$2.96 \times 10^{-7}$	337.30	Vitaminas
Biotina	1.0	$2.05 \times 10^{-9}$	244.31	Vitaminas

(Guillard, 1975).

## Fermentaciones a distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno

Se evaluaron 4 fermentaciones a distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno: 0.300 g de NaNO<sub>3</sub>/L (x1.00), 0.150 g de NaNO<sub>3</sub>/L (x0.50), 0.075 g de NaNO<sub>3</sub>/L (x0.25) y 0.03 g de NaNO<sub>3</sub>/L (x0.10). Todas se realizaron en duplicado, a excepción de la fermentación a 0.300 g de NaNO<sub>3</sub>/L que se realizó en triplicado. Para cada fermentación se utilizaron fotobiorreactores de columna de 8 L marca BioVantage. El medio de cultivo fue preparado a un volumen final de 5 L a 2% de salinidad, aireación a 1.18x10<sup>-4</sup> m<sup>3</sup>/h (15 ft<sup>3</sup>/h), la cual se definió como la fuente de carbono para el cultivo debido al flujo constante de dióxido de carbono, pH entre 8.0 y 8.5, temperatura de 22 °C, 8 horas de iluminación a una onda de luz roja e intensidad de 1500 lúmenes, presión a 0.9971 atm y 500 mL de inóculo de microalgas cultivadas previamente a las mismas condiciones en dichos fotobiorreactores. Cabe resaltar que las microalgas del inóculo se tomaron del reactor abierto tipo laguna de la Universidad Del Valle de Guatemala. Estas se analizaron previamente en microscopio para garantizar que solo hubiese microalgas *N. oculata*. Las fermentaciones se analizaron diariamente por 21 días. Se determinó la concentración celular con el equipo Muse<sup>®</sup> y la concentración de nitratos con el equipo HACH DR 890, para lo cual se tomaron muestras de 1.5 mL de cada reactor y se diluyó la muestra en 1:10 para el análisis de nitratos. Además, se monitoreo la salinidad, pH y temperatura del medio diariamente.

## Cosecha y secado de biomasa

Después de cada fermentación, el medio de cultivo fue centrifugado en la centrífuga SORVALL RT7 a 20 °C y 3000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 20 °C y 4000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante final se descartó en el reactor de laguna abierta de la Universidad Del Valle de Guatemala para aprovechar los nutrientes restantes del medio de cultivo. El medio con la biomasa concentrada se distribuyó sobre recipientes de metal y de porcelana y sobre las cajas Petri de vidrio. Estas se trasladaron a un horno secador Symphony VWR, donde se dejaron por 24 horas a 60 °C. Al término del secado, se recuperó la biomasa y se trasladó a una caja Petri previamente tarada. Por último, se pesó la biomasa recuperada en una balanza analítica.

## Cálculo de la productividad y rendimiento de células de las microalgas *N. oculata* y su biomasa

Para determinar la productividad de células de las microalgas *N. oculata* por litro de cultivo que se obtuvo al día se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta \text{Concentración celular}}{\Delta \text{Tiempo}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = \text{Productividad}$$

(Ecuación 2)

En donde los cambios en la concentración celular y en el cambio en el tiempo se determinaron desde el día 0 de fermentación hasta el punto más alto en la curva de crecimiento celular, donde se formase una recta tangente a dicha curva con la pendiente más grande.

Para determinar el rendimiento total de células de las microalgas *N. oculata* por gramo de nitrato consumido en la fermentación se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta \text{Concentración celular}}{-\Delta \text{Concentración de nitrato}} = \text{Rendimiento total}$$

(Ecuación 3)

En donde los cambios en la concentración celular y en la concentración de nitrato se obtuvo con los datos del día 0 y último día de fermentación.

Para determinar el rendimiento de la biomasa respecto a los gramos de nitrato consumidos en la fermentación se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Producción de biomasa}}{[-\Delta \text{Concentración de nitrato}] \times (V_{fbr} - V_r)} = \text{Rendimiento de biomasa}$$

(Ecuación 4)

En donde los valores de la producción de biomasa se obtuvieron del pesaje de la biomasa obtenida de cada fermentación, después de recuperarla mediante centrifugación y secarla. Asimismo, los cambios de la concentración de nitrato se obtuvo con los datos del día 0 y último día de fermentación. Por último,  $V_{fbr}$  es el volumen al que se llenó el fotobiorreactor para la fermentación y  $V_r$  el volumen retirado del medio debido al muestreo.

## Ajuste del modelo cinético que describe el crecimiento celular y el consumo de nitratos a distintas concentraciones con el software Berkeley Madonna

Con ayuda de Excel se ordenaron los datos recabados de cada fermentación de la concentración celular de microalgas y la concentración de nitratos en el tiempo. Los datos primero fueron suavizados para disminuir el ruido provocado por la metodología empleada para realizar las mediciones. Luego, fueron analizados en el software Berkeley Madonna para analizar su ajuste al modelo cinético de Monod (ver Ecuación 1). Debido a que el modelo cinético presentaba más del 5% de error al ajustarse a los datos experimentales, se modificó el modelo de Monod para considerar la concentración final de nitratos en cada fermentación, de modo que el valor del crecimiento celular específico en cada tiempo se viera afectado



por el cambio en la concentración del sustrato limitante, ya que corresponde a la concentración de sustrato realmente utilizada por las microalgas *N. oculata*, por lo que se utilizó la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \times (S - S_f)}{K_s + (S - S_f)} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento celular,  $\mu_{\max}$  es la velocidad específica máxima de crecimiento celular,  $S$  la concentración de sustrato,  $S_f$  la concentración final de sustrato y  $K_s$  la constante de afinidad al sustrato.

Asimismo, para describir la velocidad del crecimiento celular de las microalgas, se empleó la siguiente ecuación:

$$RX = \mu X \quad (\text{Ecuación 6})$$

En donde  $RX$  es la cantidad de células por volumen al día y  $X$  es la concentración de células por volumen.

Para describir la velocidad del consumo del sustrato limitante para el crecimiento celular de las microalgas se empleó la siguiente ecuación:

$$RS = \frac{RX}{Y_x} \quad (\text{Ecuación 7})$$

En donde  $RS$  es la concentración del sustrato limitante por volumen por día y  $Y_x$  el rendimiento de células por gramo del sustrato limitante.

Para describir el cambio de la concentración celular en el tiempo para el cultivo de microalgas se empleó la siguiente ecuación:

$$\frac{d}{dt}(X) = RX \quad (\text{Ecuación 8})$$

Por último, para describir el cambio de la concentración del sustrato limitante en el tiempo para el cultivo de microalgas, se empleó la siguiente ecuación:

$$\frac{d}{dt}(S) = -RS \quad (\text{Ecuación 9})$$

Además, se realizó un modelo discontinuo para que las variables de este lograsen explicar el fenómeno que afecta el crecimiento celular durante la fermentación cuando esta se da en los fines de semana. Por último, se realizó un ajuste manual de las curvas a los datos experimentales con las herramientas del software, con el fin de que el modelo se ajuste a los datos experimentales con un error menor al 5%.

Cabe mencionar que el código utilizado para realizar dichos ajustes se presenta en anexos.

## Resultados y discusión

En la Figura 1 se puede comparar el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* bajo las distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno. Cabe resaltar que en cada fermentación se aplicó un flujo constante de aireación, la cual contenía dióxido de carbono y el cual se definió como la fuente de carbono para el correcto crecimiento de las microalgas. Se definió variar solo la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo ya que en la literatura se reporta que este nutriente está estrechamente relacionado con la síntesis de proteínas estructurales y, por ende, con la producción de biomasa (Hu, 2004). Además, se aplicó la variabilidad obtenida de la fermentación realizada en triplicado a cada una de las demás fermentaciones evaluadas en duplicado, con el fin de realizar un mejor análisis estadístico entre las condiciones experimentadas. La variabilidad se obtuvo calculando el valor de 3 desviaciones estándar para contar con un 99.7% de confianza en el análisis estadístico. Aplicar la variabilidad obtenida de la fermentación en triplicado a otras fermentaciones evaluadas en duplicado mantiene la consistencia en el diseño experimental. Esto es importante para garantizar que las condiciones experimentales sean comparables y que las diferencias observadas sean atribuibles a las distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno a las que fueron analizadas las fermentaciones (Anderson, Sweeney & Williams, 2015).

Se obtuvo que a mayor concentración inicial de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, mayor densidad celular se alcanza al final de la fermentación. Se puede explicar que, gracias a que a la concentración inicial  $\times 1.00$  hay más disponibilidad de nitrógeno, las microalgas pueden seguir sintetizando proteínas estructurales, entre otras moléculas importantes para el metabolismo, por lo que se pueden seguir reproduciendo (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017), alcanzando así al final de la fermentación de 21 días, una mayor concentración celular  $[(4.15 \pm 0.26) \times 10^6]$  células viables/mL] comparado con las microalgas que crecen bajo una concentración inicial  $\times 0.50$   $[(3.36 \pm 0.21) \times 10^6]$  células viables/mL] e incluso que las concentraciones  $\times 0.25$   $[(3.53 \pm 0.22) \times 10^6]$  células viables/mL] y  $\times 0.10$   $[(2.23 \pm 0.14) \times 10^6]$  células viables/mL] (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Cabe resaltar que, las razones por las cuales no se logró alcanzar una mayor densidad celular al final de las fermentaciones, pueden ser que otro nutriente, como el fósforo, pudo actuar como sustrato limitante e influir en el crecimiento celular de las microalgas. También se pudo haber generado más productos de desecho celular que se acumularon en el medio e inhibieron el crecimiento celular.

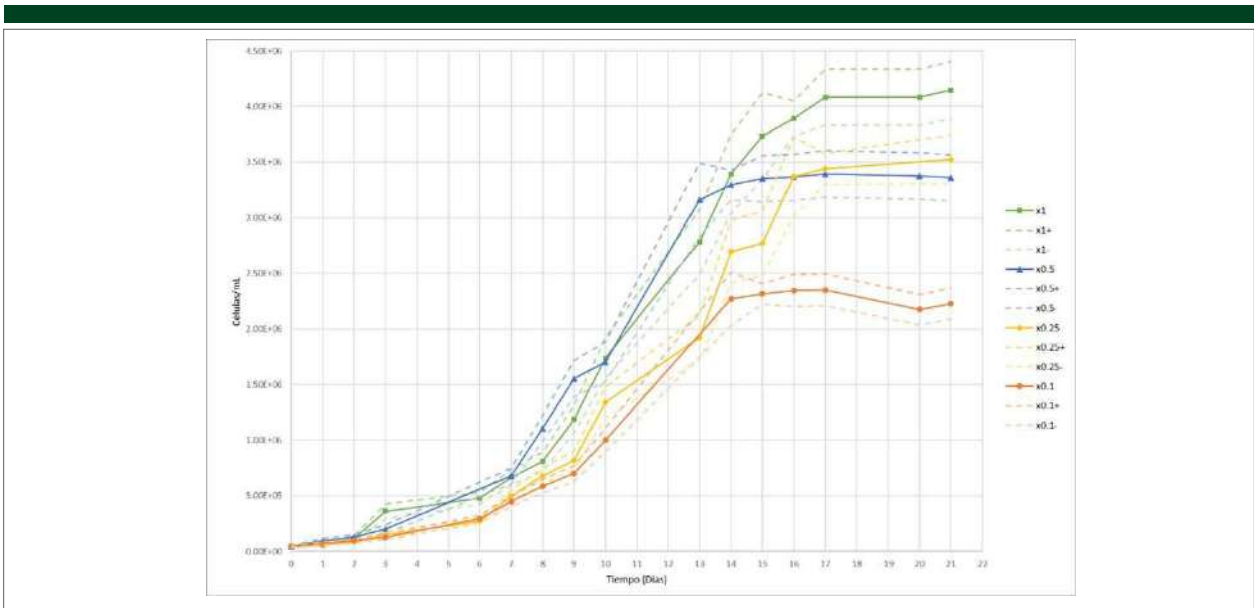


Figura 1. Comparación del crecimiento celular promedio de las microalgas *N. oculata* bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno.

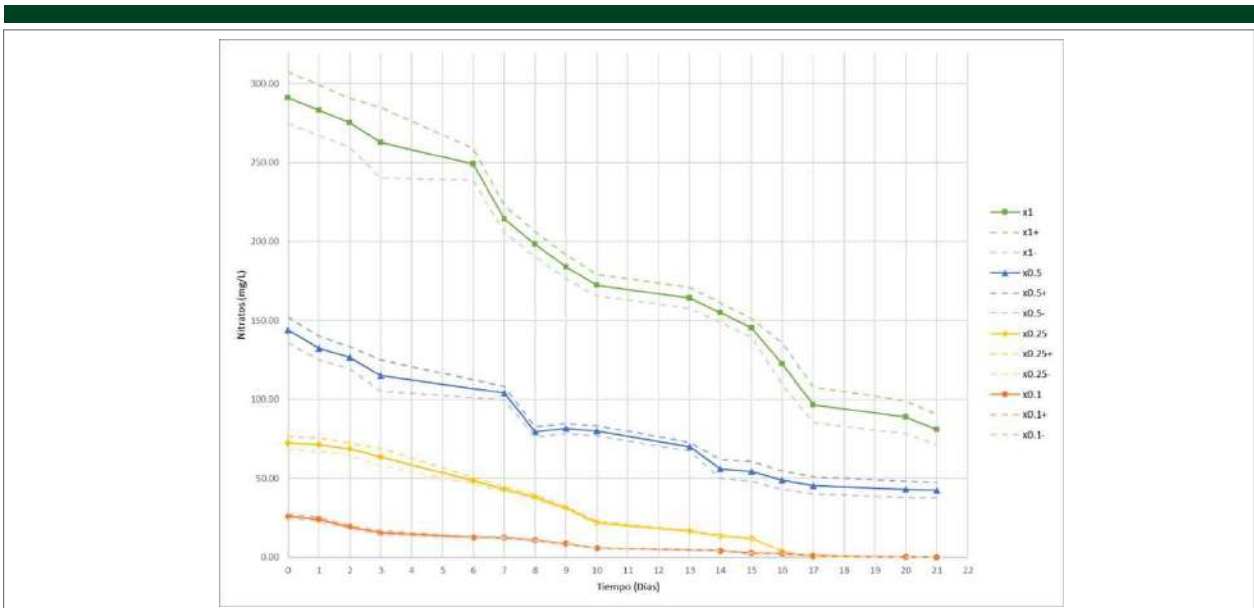


Figura 2. Comparación del consumo de nitrato promedio de las microalgas *N. oculata* bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno.

Por otro lado, la densidad celular en el medio pudo ser muy grande que no permitía que la luz llegará a todo el medio de forma homogénea, ya que las lámparas se encontraban en el exterior de los reactores e iluminaban de forma directa solo un lado de los reactores, provocando así una menor tasa de fotosíntesis y, por ende, menor crecimiento celular (Tortora, Funke y Case, 2007; Lee, 2009; Audesirk et al., 2012).

En la Figura 2 se puede observar el decaimiento en el tiempo de la concentración de nitrato de cada fermentación con una concentración inicial de la fuente de nitrógeno distinta, con

su respectiva variabilidad obtenida de la misma manera que la variabilidad de la concentración celular. Se obtuvo que a una menor concentración inicial de la fuente de nitrógeno el decaimiento de la concentración de nitratos es más pronunciado y rápido. Por ende, al final de las fermentaciones a las concentraciones x0.25 y x0.10 se logró el consumo completo de los nitratos. Se infiere que a las concentraciones iniciales x1.00 y x0.50, el nitrógeno en forma de nitrato, no se encuentra a concentraciones limitantes, pero a las concentraciones iniciales x0.25 y x0.10 si estaría a concentraciones limitantes.

En los resultados del Cuadro 2 se puede observar que se obtuvo una mayor productividad de células mientras más grande sea la concentración inicial de la fuente de nitrógeno en la fermentación. Se ha reportado en la literatura que, mientras mayor sea la concentración inicial de la fuente de nitrógeno, mayor disponibilidad de nitrógeno en forma de nitrato habrá para que las células lo aprovechen en su metabolismo y reproducción (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). Por el otro lado, se obtuvo un mayor rendimiento de células respecto al sustrato conforme disminuye la concentración inicial de la fuente de nitrógeno. Se ha demostrado previamente que cuando hay una privación de la fuente de nitrógeno, las microalgas lo aprovechan lo mejor posible para reproducirse y sobrevivir. Incluso para sintetizar lípidos como reserva de energía, pero la generación de células se verá limitada por la escasez de nutrientes (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Como se puede observar en el Cuadro 3, se obtuvo que a mayor concentración inicial de la fuente de nitrógeno, se logra una mayor producción de biomasa de microalgas *N. oculata*. En la literatura se reporta que a una mayor concentración de la fuente de nitrógeno, las microalgas tendrán disponible en el medio de cultivo mayor concentración de nitrógeno en forma de nitrato, el cual aprovechan para sintetizar proteínas estructurales y aminoácidos, importantes para el metabolismo y reproducción (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). Por el otro lado, se obtuvo que el rendimiento de biomasa respecto al nitrato, es mayor conforme disminuye la concentración inicial de la fuente de nitrógeno. Dicho fenómeno se explica porque a menor concentración de la fuente de nitrógeno, las células aprovechan de mejor manera el sustrato para su metabolismo y reproducirse, con el fin de asegurar su sobrevivencia, produciendo así una buena concentración celular, que se traduce en mayor producción de biomasa por gramo de sustrato limitante (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017). En cambio, a altas concentraciones de la fuente de nitrógeno, las células emplean más sustrato para su metabolismo y su producción, resultando en un uso ineficiente del sustrato limitante en relación con la producción de biomasa (Hu, 2004; Aléman *et al.*, 2017).

Para generar un modelo cinético de la operación del fotobiorreactor que predijese el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00, la cual permite obtener la mayor producción de biomasa, se utilizó el modelo de Monod modificado (ver Ecuación 2), ya que simplifica lo complejo que es el crecimiento celular de las microalgas, debido a las reacciones bioquímicas que conforman el metabolismo celular (Lee, 2009). Además, al analizar las gráficas generadas en Berkeley Madonna se encontró que en todas las fermentaciones el crecimiento celular presentaba comportamientos casi estacionarios durante la fase de aceleración y la fase exponencial, formando así una especie de escalones en las gráficas, lo cual no era esperado del crecimiento celular para

**Cuadro 2.** Número de parcelas experimentales por tratamiento.

Concentración de la fuente de nitrógeno	Productividad (Células/L día)	Rendimiento total (Células/g NO <sub>3</sub> )
x 1.00	$(2.46 \pm 0.26) \times 10^8$	$(1.95 \pm 0.21) \times 10^{10}$
x 0.50	$(2.40 \pm 0.25) \times 10^8$	$(3.27 \pm 0.37) \times 10^{10}$
x 0.25	$(2.08 \pm 0.22) \times 10^8$	$(4.80 \pm 0.40) \times 10^{10}$
x 0.10	$(1.59 \pm 0.17) \times 10^8$	$(8.38 \pm 0.71) \times 10^{10}$

**Cuadro 3.** Comparación de la biomasa recuperada y su rendimiento de la producción de las microalgas *N. oculata* bajo distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno.

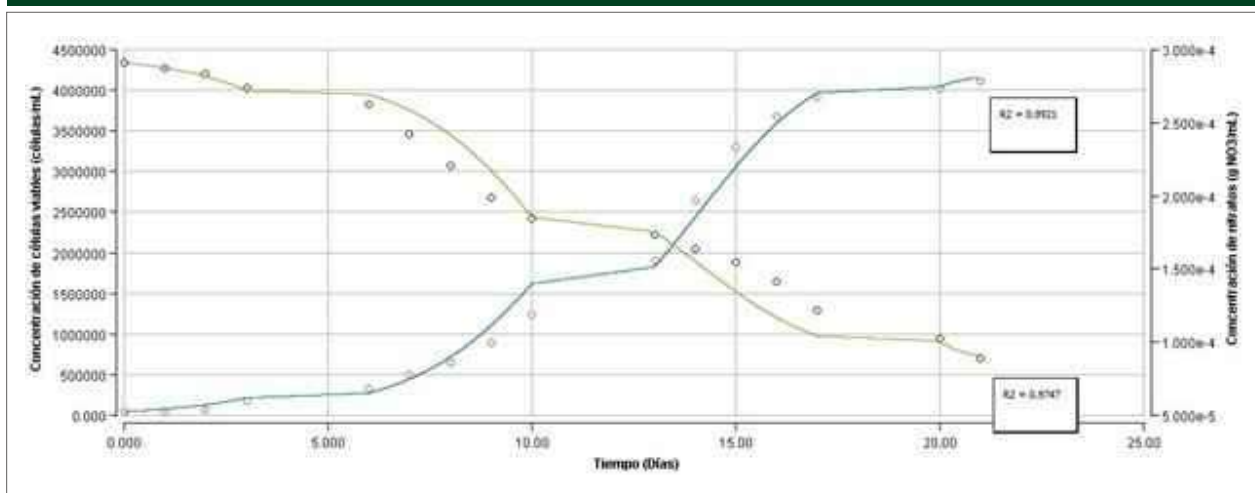
Concentración de la fuente de nitrógeno	Recuperación de biomasa ( $\pm 0.0193$ g)	Rendimiento de biomasa (g biomasa/g NO <sub>3</sub> )
x 1.00	12.5005	$11.9627 \pm 1.0822$
x 0.50	11.2350	$22.2380 \pm 2.0916$
x 0.25	10.3586	$28.7046 \pm 1.6232$
x 0.10	9.1464	$72.4731 \pm 4.0988$

dichas fases. De la misma forma, se encontró que el consumo de nitratos presentaba dichas fases estacionarias.

Estas fases coinciden con los 3 intervalos de tiempo en los no se muestreo el sistema por ser días de fin de semana. Por lo tanto, los “escalones estacionarios” se produjeron por factores externos de la fermentación. Específicamente, por la metodología empleada en los días hábiles de la semana, donde se aplicaba una homogenización extra de la biomasa del sistema para el muestreo. Sin embargo, del viernes al lunes, pasaban 72 horas sin el procedimiento extra de homogenización del medio de cultivo y sin muestreo.

Por lo tanto, se infiere que esta falta de homogenización dio lugar a un cierto grado de heterogeneidad en el reactor. En consecuencia, el crecimiento celular se pudo haber visto afectado debido a una falta de acceso a nutrientes y a una iluminación limitada de la cepa. Por ende, el consumo de nitratos presenta la tendencia complementaria al crecimiento celular durante esos días de la fermentación, provocando el comportamiento reflejado en las gráficas. En cambio, al observar el comportamiento de las gráficas durante los días de fermentación que coinciden con los días hábiles, se obtiene que es continuo y acorde a la fase de crecimiento celular.

Debido a esto, se desarrolló un modelo cinético con parámetros que explican la fermentación en los días hábiles, donde el muestreo fue continuo, y con parámetro cinéticos



**Figura 3.** Ajuste del modelo de Monod modificado utilizando datos experimentales del crecimiento celular de la microalga *N. oculata* y el consumo de nitratos a una concentración inicial de la fuente de nitratos de x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L.

**Código de colores:** curva azul - ajuste matemático de la concentración celular obtenido con el Software Berkeley Madonna® con R<sup>2</sup> de 0.9921, curva verde - ajuste matemático de la concentración de nitratos obtenido con el Software Berkeley Madonna® con R<sup>2</sup> de 0.9747, puntos naranjas - datos experimentales de la concentración celular obtenidos a partir del MUSE®, puntos negros - datos experimentales de la concentración de nitratos obtenidos a partir del HACH DR 890.

que explican el fenómeno ocurrido durante los días de fin de semana, donde no se realizó el muestreo. Cabe resaltar que, para el parámetro de rendimiento de células respecto a sustrato, también se definió un valor distinto dependiendo de la fase del crecimiento celular. En la literatura se justifica porque, al estar las microalgas en privación de nitrógeno, comienzan a acumular lípidos, por lo que su composición celular, e incluso tamaño, varía con el tiempo (Hu, 2004; Aléman et al., 2017).

Como se puede observar en las Figuras 3 y en el Cuadro 4, en el ajuste del modelo cinético a los datos experimentales de la fermentación a una concentración inicial x1.00, al emplear el modelo cinético de Monod modificado y ajustar los parámetros cinéticos dependiendo si la fermentación se encuentra en días de fin de semana o en días hábiles, se logra que el modelo se ajuste a los datos experimentales con un valor de R<sup>2</sup> para ambas curvas mayor al 0.97, es decir, el modelo se ajusta con un 97% de confianza. Se infiere que el modelo cinético empleado y los ajustes de los parámetros cinéticos describen con buena exactitud el crecimiento celular de las microalgas y su consumo de sustrato. Sin embargo, la alta densidad celular alcanzada en el sistema puede impactar en los parámetros del modelo cinético. Esto se debe a que la luz no llega de manera homogénea a todo el cultivo y este fenómeno provoca que el sustrato limitante deje de ser el nitrato como la fuente de nitrógeno y pase a ser la iluminación del sistema. Cabe resaltar que esta variable impacta directamente a la  $\mu_{max}$  del modelo. Sin embargo, en el Modelo de Monod presentado no se incluye una variable extra que represente la iluminación, ya que, al establecer el

sistema fermentativo bajo una iluminación constante, el  $\mu_{max}$  ya consideraría los efectos de esta variable sobre el crecimiento celular. Es importante aclarar que se expone únicamente la gráfica del ajuste del modelo cinético a los datos experimentales de la fermentación a una concentración inicial x1.00, ya que es el modelo que permite predecir el crecimiento celular de las microalgas bajo la concentración inicial de la fuente de nitrógeno que favorece a la mayor producción de células y, por ende, de biomasa.

Al analizar los parámetros cinéticos que describen el fenómeno que ocurre en los días de fermentación que coinciden con los días de fin de semana (Cuadro 4), se obtiene que los valores de  $\mu_{maxf}$ ,  $K_{sf}$  y  $Y_{xf}$ , son iguales para todas las fermentaciones, independientemente de la concentración inicial de la fuente de nitrógeno a la que se llevaron a cabo. Se definió de esta manera puesto que es el mismo fenómeno el que afecta a todas las fermentaciones en los días de fin de semana. Sin embargo, al comparar estos parámetros con los que describen la fermentación en los días hábiles, se obtiene que el valor de  $\mu_{maxf}$  y  $K_{sf}$  son muchísimo mayores que los valores de  $\mu_{max}$  y  $K_s$  de cada fermentación.

Los resultados indicarían que las microalgas alcanzan una mayor velocidad de crecimiento específica en los días de fin de semana, pero a la vez cuentan con una afinidad al sustrato muchísimo menor que en los días hábiles de la semana, respectivamente. De esta forma se respaldaría el fenómeno discutido anteriormente, en el que se resalta que al sedimentarse las microalgas y el medio de cultivo, no se cuenta con la misma homogeneidad del sustrato y las



**Cuadro 4.** Parámetros cinéticos del modelo matemático que describe el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* a la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 en el fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L obtenidos con el Software Berkley Madonna®

Parámetro	$\mu_{max}$	$K_s$	$Y_{x_1}$	$Y_{x_2}$	$Y_{x_3}$	$Y_{x_4}$	$\mu_{maxf}$	$K_{sf}$	$Y_{x_f}$
Período	t < 3, 10, 17 y t > 20	t < 3, 10, 17 y t > 20	t < 3	t > 6 y t < 10	t > 13 y t < 17	t > 20	t < 6, 13, 20	t < 6, 13, 20	t < 6, 13, 20
Valor									
fermentación x1.00	1.0842	$2.1015 \times 10^{-4}$	$9.0016 \times 10^9$	$1.6035 \times 10^{10}$	$3.0066 \times 10^{10}$	$1.1302 \times 10^{10}$	$7.8401 \times 10^{12}$	$1.8002 \times 10^{10}$	$2.1046 \times 10^{10}$

\*Donde  $\mu_{max}$  es la velocidad específica máxima de crecimiento celular ( $\text{días}^{-1}$ ),  $K_s$  la constante de afinidad al sustrato ( $\text{g NO}_3/\text{mL}$ ),  $Y_{x_1}$  el rendimiento máximo de biomasa en función al consumo de sustrato para la fase lag (células/g  $\text{NO}_3$ ),  $Y_{x_2}$  el rendimiento máximo de biomasa en función al consumo de sustrato para la parte 1 de la fase exponencial (células/g  $\text{NO}_3$ ),  $Y_{x_3}$  el rendimiento máximo de biomasa en función al consumo de sustrato para la parte 2 de la fase exponencial (células/g  $\text{NO}_3$ ),  $Y_{x_4}$  el rendimiento máximo de biomasa en función al consumo de sustrato para la fase estacionaria (células/g  $\text{NO}_3$ ),  $\mu_{maxf}$  la velocidad específica máxima de crecimiento celular para los días en fin de semana ( $\text{días}^{-1}$ ),  $K_{sf}$  la constante de afinidad al sustrato para los días en fin de semana ( $\text{g NO}_3/\text{mL}$ ) y  $Y_{x_f}$  el rendimiento máximo de biomasa en función al consumo de sustrato para los días en fin de semana (células/g  $\text{NO}_3$ ).

microalgas no lo pueden aprovechar de la misma manera, viéndose afectado así su crecimiento celular (Hu, 2004; Lee, 2009). Por último, se observa que el valor de  $Y_{x_i}$  en general es menor que los valores de los rendimientos de células respecto a sustrato de cada fermentación en los días hábiles. Nuevamente, los resultados sustentan que las microalgas en los fines de semana no fueron capaces de aprovechar correctamente el sustrato limitante para reproducirse a la misma tasa que en los días hábiles de fermentación.

## Conclusiones

La concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00 (0.300 g  $\text{NaNO}_3/\text{L}$ ) permite obtener la mayor producción de biomasa de las microalgas *N. oculata*, siendo esta de  $12.5005 \text{ g} \pm 0.0193 \text{ g}$ . Sin embargo, la concentración inicial de la fuente de nitrógeno x0.10 (0.030 g  $\text{NaNO}_3/\text{L}$ ) permite obtener el mayor rendimiento de biomasa, el cual es de  $72.4731 \text{ g biomasa/g NO}_3^-$ . Se desarrolló un modelo cinético discontinuo, basado en el modelo de Monod, para describir el crecimiento celular de las microalgas *N. oculata* y su respectivo consumo de nitrato como sustrato limitante, a distintas concentraciones iniciales de la fuente de nitrógeno, en un fotobiorreactor de columna de burbuja ascendente de 8 L. Los parámetros cinéticos de la fermentación a una concentración inicial de la fuente de nitrógeno x1.00, la cual generó la mayor producción de biomasa, son:  $\mu_{max} = 1.0842 \text{ días}^{-1}$  y  $K_s = 2.1015 \times 10^{-4} \text{ g NO}_3^-/\text{mL}$  para una operación homogénea. Asimismo, la parametrización permitió obtener distintos rendimientos de células respecto al consumo de sustrato en función de la fase del crecimiento celular.

En síntesis, con el modelo cinético presentado se pueden analizar las variaciones cíclicas de un sistema homogéneo-heterogéneo que tiende a la sedimentación de biomasa. Estos sistemas cíclicos podrán ser analizados bajo condiciones constantes de aireación, pH y temperatura. Cabe resaltar que el modelo integra los efectos del nutriente limitante, así como el impacto que tiene la iluminación en el crecimiento de las microalgas.

## Recomendaciones

Se recomienda estudiar la implementación de iluminación roja dentro del reactor, mediante lámparas tubulares y manteniendo la intensidad a 1500 lúmens, para que el cultivo de microalgas reciba de forma homogénea la iluminación. Asimismo, se propone cambiar los difusores de aire tubulares por unos de placa porosa, de modo que se le pueda brindar al cultivo una microaireación desde toda la base del fotobiorreactor. De esta forma se espera lograr un cultivo de microalgas con mayor grado de homogeneidad, al evitar la sedimentación de la biomasa y maximizar su producción en este equipo. Ambas recomendaciones pueden ser enfoque de futuros estudios.

## Bibliografía

- Alami, A. H., Alasad, S., Ali, M., & Alshamsi, M. (2020). Investigating algae for CO2 capture and accumulation and simultaneous production of biomass for biodiesel production. *Science of The Total Environment*, 143-529.
- Aléman-Nava, G. S., Muylaert, K., Cuellar Bermudez, S. P., Depraetere, O., Rittmann, B., Parra-Saldívar, R., & Vandamme, D. (2017). Two-stage cultivation of *Nannochloropsis oculata* for lipid production using reversible alkaline flocculation. *Bioresource Technology*, 226(1). 18-23

- Anderson, D., Sweeney, D. & Williams, T. (2015). *Estadística para Negocios y Economía*. 12ª ed. Cengage Learning, México
- Audesirk, T. et al. (2012). *BIOLOGÍA. La Vida en la Tierra con Fisiología*. 9ª ed. México: Pearson.
- Bi, Z., & He, B. (2020). Biodiesel from microalgae. *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*, 329-371. doi:10.1016/b978-0-12-818536-0.00013-0
- Chisti, Yusuf. (2007). «Biodiesel from microalgae». *Biotechnology Advances*. 5 (25): 294-306.
- Eriksen, N. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30(9), 1525-1536.
- Ganesan, R. et al. (2020). A review on prospective production of biofuel from microalgae. *J. of Biotechnology Reports*, 27(1). 1-13.
- Gharagozloo, Patricia & Drewry, Jessica & Collins, Aaron & Dempster, Thomas & Choi, Christopher & James, Scott. (2014). Analysis and modeling of *Nannochloropsis* growth in lab, greenhouse, and raceway experiments. *Journal of Applied Phycology*. 26.
- Guillard, R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.
- Hu, Q. (2004). Environmental Effects on Cell Composition. In Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 83-93). Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Lee, J. (2009). *Biochemical Engineering*. Estados Unidos: Washington State University. 945 págs.
- Moreno, J, et al. (2016). *De Residuo a Recurso. El Camino hacia la Sostenibilidad*. España: Ediciones Mundi-Prensa. 329 págs.
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Panamá: Médica Panamericana.

