

UNIVERSIDAD DEL MAR



**CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO ESTÁTICO EN FOTOBIORREACTORES
CON ILUMINACIÓN FLUORESCENTE-FRÍA Y LED's DE *Chlorella vulgaris*
AISLADA DE ESTANQUES DE CULTIVOS ACUÍCOLAS**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el Título Profesional de
Ingeniero en Acuicultura

Presenta

Alejandra Honda Merino

Directora:

M. en C. Alejandra Torres Ariño

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2019

Resumen

Actualmente, la biotecnología está adentrándose cada vez más en diferentes áreas de la ciencia, a través del cultivo de microalgas. Es bien sabido que a partir de este tipo de microorganismos se obtienen diferentes productos para distintas industrias como farmacéutica, energética, cosmética, nutricional entre otras. Todos los procesos en donde los microorganismos con capacidad de fotosíntesis hacen del campo tecnológico de la naturaleza una alternativa hacia la solución de problemas ambientales de magnitud global. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el rendimiento del cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* bajo dos diferentes sistemas de iluminación LED's y Fluorescente, en términos de biomasa, pigmentos y porcentaje de proteínas. El desarrollo experimental partió de hacer escalamientos de cultivo de la microalga, hasta llegar a columnas de 80 L con medio Q Foska foliar 10-4-7; durante el cultivo se realizó recuento celular, lectura de densidad óptica por medio de un espectrofotómetro, se llevó a cabo la evaluación de peso seco y extracción de pigmentos y proteínas, así mismo, se hizo una caracterización de la microbiota asociada al cultivo; dando como resultado que en la cinética de crecimiento por recuento celular las tendencias fueron similares entre los tratamientos. Sin embargo, la mayor concentración fue en el tratamiento con luz LED's (L1) con una concentración de $69.6 \times 10^5 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ en la fase estacionaria, seguida de LED's (L2) con una concentración $67.6 \times 10^5 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para el experimento con luz Fluorescente fueron de menor concentración $60.2 \times 10^5 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ para (F1) y $51.2 \times 10^5 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ para (F2). En este caso, las curvas de crecimiento determinadas por peso seco presentaron crecimiento exponencial hasta $10.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ donde se mantuvo estable hasta el final del experimento, se aplicaron pruebas de contraste para el incremento celular por densidad óptica, en donde hubo diferencias significativas, al igual que en peso seco; por el contrario, para recuento celular no se mostraron diferencias significativas. En la determinación de clorofila α la mayor concentración se dio el día seis con $0.18 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, hasta el día 26 hubo un decremento hasta llegar a $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ para LED's y para el tratamiento con luz Fluorescente la concentración más baja fue del 4 al 9 día con $0.12 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ y $0.15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ y la mayor concentración se presentó del 27 al 30 día con $0.24 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. En cuanto al porcentaje de proteína, el valor máximo fue de 35% en el día 7 para LED's y para Fluorescente se presentó en el mismo día, pero fue de 33-34% de proteína. Si bien no existieron diferencias significativas en las determinaciones, los mejores valores fueron en luz LED's que representan menor consumo de energía, una vida útil más larga, una robustez física mejorada, un tamaño más pequeño, así como la posibilidad de fabricarlos en muy diversos colores del espectro visible de manera mucho más definida y controlada para emplearla en diversas microalgas y evaluar su potencial.

Palabras clave: *Chlorella vulgaris*, cultivo, fotobiorreactores, fotosíntesis, iluminación.

Dedicatoria

Con mucho amor y cariño...

A mi mamá:

Gracias a tu cariño, comprensión, esfuerzo y amor logramos finalizar esta gran etapa, a pesar de los tiempos difíciles logramos salir adelante como buenas guerreras, te amo muchísimo ma, eres mi mejor ejemplo por seguir, siempre contigo <3

A mis hermanos:

Liz y Tato gracias por estar conmigo y apoyarme en todo momento, son los más chingones, los quiero :D

Finalmente...

A ti morch:

Eduardo Chan, gracias por siempre estar ahí, apoyándome incondicionalmente por levantarme los ánimos cuando más lo necesité, por compartir conmigo tanto tiempo; vamos por más, sigamos cumpliendo los sueños y metas que nos hemos propuesto en este tiempo,

¡Te amo!

Agradecimientos

A mi directora: la **M. en C. Alejandra Torres Ariño**, por la dirección de esta tesis, por sus consejos académicos, por su apoyo en todos los sentidos, su paciencia y sobre todo por brindarme su amistad y soporte en todo momento durante y después de la universidad. Así como el recurso personal e institucional a través del subsidio para gastos de operación.

A mis revisores: la **M. en C. Yolanda Huante González, Ocean. Ángel Cuevas Aguirre, Dr. Antonio López Serrano y Dr. Javier Salinas Luna** por su tiempo y valiosas observaciones a este trabajo.

Al cuerpo académico de Ingeniería Industrial y Entorno (CA-II&E) de la Universidad Autónoma de la Mixteca (UTM) conformado por el M. en C. Moisés Manzano Herrera (Responsable del CA), M. en C. Carlos Vázquez Cid de León, M. en C. Salvador Montesinos González, por proporcionar parte del recurso para que esta tesis se llevará a cabo a través del proyecto **Diseño y manufactura de un fotobiorreactor para el cultivo de microalgas**, clave UTMIX-CA-37.

A mis amigos **Iván, Abril, Jared, Dian**, chiquillas gracias por todos los momentos que pasamos juntos, por los viajes improvisados, por las cenas, por las “reuniones tranquilas”, los quiero mucho; **Isma, Ely, Negro, Dani (señorita T), Pulga**, mil gracias por su gran amistad, por las comiditas que hacíamos y sobre todo por los momentos de risa que siempre hubo, y recuerden que el S.A. es lo mejors jajaja

A la Familia **Chan Cruz** por abrirme las puertas de su casa y por brindarme hogar familiar, apoyarme en todo momento incondicionalmente, los quiero mucho.

ÍNDICE	
I.	INTRODUCCIÓN.....1
1.1	Microalgas2
1.2	Cultivo de microalgas.....2
1.3	Parámetros físicos para el cultivo.....6
1.4	<i>Chlorella vulgaris</i>12
II.	ANTECEDENTES13
III.	JUSTIFICACIÓN.....19
IV.	HIPÓTESIS DEL TRABAJO.....20
V.	OBJETIVOS.....20
5.1	General20
5.2	Particulares20
VI.	METODOLOGÍA.....21
6.1	Obtención de la microalga.....21
6.2	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>22
6.2.1	Escalamiento y siembra en tubos de ensayo.....22
6.2.2	Escalamiento y siembra en Matraz de 250 mL22
6.2.3	Escalamiento y siembra en botellas de 500 mL22
6.2.4	Escalamiento y siembra masiva.....22
6.3	Curva de crecimiento mediante recuento celular23
6.4	Curva de crecimiento mediante densidad óptica.....24
6.5	Extracción y cuantificación de proteínas25
6.6	Extracción y cuantificación de pigmentos26
6.7	Caracterización microbiológica del cultivo.....28
6.7.1	Prueba Oxidasa29
6.7.2	Prueba Catalasa29
6.7.3	Prueba de Oxidación-Fermentación de Hugh-Leifson (O/F)30
6.7.4	Prueba de Tinción Gram.....31
6.8	Análisis de datos.....32
VII.	RESULTADOS.....33
VIII.	DISCUSIÓN49

IX.	CONCLUSIONES	55
X.	RECOMENDACIONES	56
XI.	REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Curva típica de crecimiento poblacional (Vonshak & Maske 1982).....	3
Figura 2.	Fotobiorreactor de biocombustible de microalgas.	4
Figura 3.	Elementos fundamentales de una lámpara Fluorescente.	7
Figura 4.	Espectros de absorción (arriba) y emisión (abajo) del mercurio	7
Figura 5.	Longitud de radiación coherente	8
Figura 6.	Longitud de onda luz incoherente	8
Figura 7.	Estructura de un dispositivo LED.....	9
Figura 8.	Microfotografía de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> , mostrando su modo de agregación característico (Fuente propia).	13
Figura 9.	Secuencia de actividades del desarrollo experimental.	21
Figura 10.	Diseño de escalamiento del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	22
Figura 11.	Escalamiento del cultivo de <i>C. vulgaris</i> , bajo dos sistemas de iluminación, luz LED's y luz Fluorescente. a) Cultivo en 5 L b) Cultivo en garrafones de 10 L c) y d) Cultivo en fotobiorreactores de 80 L radiado con luz Fluorescente y luz LED's.....	23
Figura 12.	Proceso del recuento celular, de muestras tomadas a partir del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación. a) Material y muestra del cultivo <i>C. vulgaris</i> fijadas en Lugol, b) Cámara de Neubauer con muestra del cultivo, c) Recuento celular en microscopio óptico.	24
Figura 13.	Evaluación de densidad óptica por medio de Espectrofotometría, de muestras tomadas a partir del cultivo de <i>C. vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación. a) Muestra fresca del cultivo b) Celda de cuarzo con muestra del cultivo, c) Información del espectrofotómetro.....	24
Figura 14.	Extracción de Proteínas, de muestras tomadas a partir del cultivo de <i>C. vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación. a) Filtros con cultivo macerados, b) Proceso de sonicación, c) Centrifugación de muestras, d) Extracto obtenido a partir de los filtros, e) Muestras con solución Folín, f) Lectura en espectrofotómetro a 70 nm.	26
Figura 15.	Extracción de Pigmentos, de muestras tomadas del cultivo de <i>C. vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación. a) Filtros con cultivo macerados, b) Adición de acetona al 90%, c) Centrifugación de muestras, d) y e) Pastilla celular y separación de sobrenadante, f) Extracto obtenido, g) Lectura en espectrofotómetro de 350-750 nm.....	27
Figura 16.	Placas de Agar Nutritivo con colonias bacterianas, aisladas del cultivo de <i>C. vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación. a) Siembra de muestra a partir del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> , b) Resiembra de la misma muestra.	28
Figura 17.	Técnica de siembra por estría cruzada para llevar a cabo la inoculación a partir de una muestra del cultivo de <i>C. vulgaris</i> bajo los distintos sistemas de iluminación.	29
Figura 18.	Prueba oxidasa a partir de colonias aisladas del cultivo de <i>C. vulgaris</i> bajo dos	

sistemas de iluminación. a) Toma de reactivo N, N, N, N, N tetrametil p-fenilendiamina, b) Colocación del reactivo en papel filtro, c) Toma de muestra de la colonia bacteriana aislada del cultivo, d) Extensión de la colonia bacteriana sobre el papel filtro.	29
Figura 19. Prueba catalasa para muestras coloniales, aisladas del cultivo de <i>C. vulgaris</i> bajo dos sistemas de cultivo. a) Toma de muestra colonia bacteriana, b) Preparación de la muestra colonial en agua oxigenada, c) Colocación para la reacción, d) Resultado de la prueba.....	30
Figura 20. Prueba Oxidación/Fermentación, de cepas aisladas a partir del cultivo de <i>C. vulgaris</i> bajo dos sistemas diferentes de iluminación. a) Toma de muestra de una colonia bacteriana, b) Inoculación en tubo de ensayo, c) Adición de aceite mineral en tubos de ensayo, d) Resultado de la prueba posterior a la incubación.	31
Figura 21. Proceso para la coloración Gram de bacterias aisladas del cultivo de <i>C. vulgaris</i>	31
Figura 22. Tinción Gram de bacterias, aisladas del cultivo de <i>C. vulgaris</i> bajo dos sistemas diferentes de iluminación. a) Preparación de la muestra con una gota de agua destilada, b) Selección de la colonia bacteriana a utilizar, c) Fijación de la muestra, c) Tinción Gram. .	32
Figura 23. Crecimiento poblacional por recuento celular (Ln (Cél. mL^{-1})) de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> , bajo dos sistemas diferentes de iluminación, en cultivo estático a nivel de 80 L y condiciones controladas de laboratorio.	33
Figura 24. Comparación de tratamientos por recuento celular, del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas diferentes de iluminación.....	34
Figura 25. Comparación de tratamientos por densidad óptica (abs. $_{350nm-750nm}$), del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas diferentes de iluminación.....	34
Figura 26. Crecimiento poblacional por peso seco ($g \cdot L^{-1}$), de muestras obtenidas de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> , bajo dos sistemas diferentes de iluminación.....	35
Figura 27. Comparación de tratamientos por peso seco ($g \cdot L^{-1}$), del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas diferentes de iluminación.	35
Figura 28. Concentración de clorofila <i>a</i> (abs. $_{664 nm}$) conforme el incremento celular directo del cultivo a lo largo del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación. .	36
Figura 29. Comparación de tratamientos por clorofila <i>a</i> (abs. $_{664 nm}$), directo cultivo del de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas diferentes de iluminación.....	37
Figura 30. Espectro de absorción (abs. $_{350-750 nm}$) de la microalga <i>C. vulgaris</i> directo del cultivo y comparación de los tratamientos de luz LED's y luz Fluorescente.	38
Figura 31. Determinación y comparación del espectro de absorción en tratamientos iluminados con luz LED's y Fluorescente en el cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> , mediante extracción con acetona al 90%.....	39
Figura 32. Determinación de clorofila (abs. $_{664nm}$) empleando el disolvente y conforme el incremento celular a lo largo del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación.....	39
Figura 33. Porcentaje de proteína durante el cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación.....	40
Figura 34. Comparación entre la curva cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación.....	41

Figura 35. Comparación de tratamientos por porcentaje de Proteína, del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas diferentes de iluminación.	42
Figura 36. Comparación entre la variable temperatura (°C) y el incremento celular (Cél.·mL ⁻¹) del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación.	42
Figura 37. Comparación de tratamientos para la variable temperatura (°C) en el cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación.	43
Figura 38. Comparación entre la variable pH y el incremento celular del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación.	44
Figura 39. Comparación de tratamientos para la variable pH en el cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación.	44
Figura 40. Morfología microscópica de bacterias aisladas y teñidas por Gram, provenientes del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> bajo dos sistemas de iluminación, obtenidas por microscopia. El tamaño de las células individuales fue de aproximadamente 2 µm para cocos y de 4-5 µm en 60X.	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Comparación entre tratamientos y resultados obtenidos a partir del análisis estadístico.	45
Tabla II. Resultados del análisis microbiológico y pruebas bioquímicas en <i>Chlorella vulgaris</i> , en fotobiorreactores bajo dos sistemas de iluminación.	46
Tabla III. Características macroscópicas de los aislados microbianos obtenidos a partir del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> en fotobiorreactores bajo dos sistemas de iluminación.	48

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Instituciones y Laboratorios

LBM Laboratorio de Biotecnología de Microalgas

UMAR Universidad del Mar, *campus* Puerto Ángel

Símbolos

CHLV	<i>Chlorella vulgaris</i>
QFF	Foska Foliar 10-4-7
FBR	Fotobiorreactor
LED's	Diodos emisores de luz
Abs.	Absorbancia
(λ)	Longitud de onda
nm	Nanómetro
pH	Potencial de Hidrógeno
mm	Mililitros
μm	Micrómetros
°C	Grado Celsius
mL	Mililitros
L	Litros
μg	Microgramos
L1	Tratamiento con LED's 1
L2	Tratamiento con LED's 2
F1	Tratamiento Fluorescente 1
F2	Tratamiento Fluorescente 2
W	Whatt
μmol	Micromoles
μE	MicroEinstein
Cél.	Células
m²	Metro cuadrado
s	Segundo
μg	Microgramos
NPK	NitroFoska
L/min	Litros por minuto
mgL⁻¹d⁻¹	Miligramos por litro por día
Hg	Mercurio
mcd	Micro candela
IRC	Índice de Reproducción Cromática