



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Optimización de las condiciones de cultivo de un consorcio
microbiano fotosintético de uso potencial como biofertilizante**

TESIS
Que presenta

DULCE JAZMÍN HERNÁNDEZ MELCHOR

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de Tesis:

Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A las instituciones que apoyaron y otorgaron financiamiento para la elaboración del presente proyecto CONACYT e ICYTDF Proyecto: 69/2010

Al CONACYT por la beca otorgada para llevar a cabo mis estudios de doctorado.

A mi directora de tesis Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva

A los miembros del comité tutorial:

Dra. María Eugenia Hidalgo Lara (CINVESTAV)

Dr. Fernando Esparza García (CINVESTAV)

Dr. Eliseo Cristiani Urbina (ENCB, IPN)

Dr. Javier Carmona Jiménez (Facultad de Ciencias, UNAM)

Dr. Ronald Ferrera Cerrato (Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1 Distribución e importancia de las cianobacterias	- 2 -
1.2 Fijación de nitrógeno.....	- 4 -
1.3 Estrategias que tienen las cianobacterias para fijar nitrógeno: desacoplamiento y heterocistos	- 5 -
1.3.1 Complejo Nitrogenasa.....	- 5 -
1.3.2 Heterocisto (estructura y función)	- 7 -
1.4 Fotobiorreactores	- 9 -
1.4.1 Sistemas abiertos.....	- 9 -
1.4.2 Sistemas cerrados (Fotobiorreactores)	- 10 -
1.4.3 Fotobiorreactores <i>flat-panel</i>	- 15 -
2. ANTECEDENTES	- 17 -
3. JUSTIFICACIÓN	- 21 -
4. HIPÓTESIS	- 21 -
5. OBJETIVOS	- 22 -
5.1 General	- 22 -
5.2 Específicos.....	- 22 -
6. PLAN DE TRABAJO	- 23 -
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 24 -
7.1 ETAPA 1. Mantenimiento e identificación morfológica del CM en un fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 11 L	- 24 -
7.2 ETAPA 2. Actividad metabólica del CM	- 25 -
7.3 ETAPA 3. Producción en lote del CM en un FBR de 50 L.....	- 27 -
7.3.1 Peso seco	- 28 -
7.3.2 Actividad de nitrogenasa	- 28 -
7.3.3 Clorofila <i>a</i>	- 29 -
7.3.4 Amonio	- 29 -
7.3.5 Fósforo	- 29 -
7.3.6 pH.....	- 30 -
7.4 ETAPA 4. Escalamiento ascendente y descendente del FBR de 50 L a un volumen de 150 L y de 16 L.....	- 30 -
7.4.1 Escalamiento ascendente del FBR	- 30 -
7.4.2 Escalamiento descendente	- 31 -
7.4.3 Microorganismo y condiciones de cultivo	- 34 -
7.4.4 Caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa	- 35 -
7.5 ETAPA 5. Optimización de las condiciones de cultivo del CM en un FBR de 150 L bajo condiciones controladas	- 37 -
7.6 ETAPA 6. Diseño del bioproceso para la producción del biofertilizante a escala semi piloto.....	- 39 -
7.7 ETAPA 7. Producción del CM por lote y lote secuencial en un FBR de 150 L a la intemperie.....	- 40 -
7.7.1 Producción en cultivo por lote	- 40 -
7.7.2 Producción por lote secuencial	- 41 -
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 42 -
8.1 ETAPA 1. Mantenimiento e identificación morfológica del CM en un FBR tipo columna de burbujas de 11 L	- 42 -
8.2 ETAPA 2. Actividad metabólica del CM	- 47 -
8.2.1 Actividad de fosfatasa	- 47 -

8.2.2 Análisis microbiológico	- 50 -
8.3 ETAPA 3. Producción en lote del CM en un FBR de 50 L.....	- 52 -
8.4 ETAPA 4. Escalamiento ascendente y descendente del FBR de 50 L a un volumen de 150 L y de 16 L.....	- 58 -
8.4.1 Tiempo de mezclado	- 58 -
8.4.2 Gas hold-up (ϵ).....	- 60 -
8.4.3 Coeficiente volumétrico de transferencia de masa.....	- 62 -
8.4.4 Potencia volumétrica (P/V).....	- 67 -
8.5 ETAPA 5. Optimización de las condiciones de cultivo del CM en un FBR de 150 L bajo condiciones controladas	- 69 -
8.6 ETAPA 6. Diseño del bioproceso para la producción del biofertilizante a escala semi piloto.....	- 83 -
8.7 ETAPA 7. Producción del CM por lote y lote secuencial en un FBR de 150 L a la intemperie.....	- 85 -
8.7.1 Producción en cultivo por lote (FBR 16 L).....	- 85 -
8.7.2 Producción en cultivo por lote (FBR 16, 50 y 150 L).....	- 88 -
8.7.3 FBR 16 L lote secuencial	- 94 -
8.7.4 FBR 150 L lote secuencial	- 98 -
8.8 Análisis de costos del bioproceso	- 105 -
9. CONCLUSIONES	- 107 -
10. RECOMENDACIONES	- 108 -
11. BIBLIOGRAFÍA	- 109 -

ÍNDICE DE ECUACIONES

	Página
Ecuación 1. Abundancia relativa.....	-25-
Ecuación 2. Velocidad específica de crecimiento.....	-30-
Ecuación 3. gas hold-up.....	-35-
Ecuación 4. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa.....	-36-
Ecuación 5. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa global.....	-36-
Ecuación 6. Potencia volumétrica.....	-36-

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de los Órdenes de cianobacterias	- 1 -
Tabla 2. Compuestos producidos por microalgas y cianobacterias	- 3 -
Tabla 3. Ventajas y limitaciones de los fotobiorreactores cerrados.....	- 11 -
Tabla 4. Criterios de escalamiento para fotobiorreactores flat-panel	- 16 -
Tabla 5. Sistemas biofertilizantes.....	- 19 -
Tabla 6. Análisis microbiológico del CM en diferentes medios de cultivo	- 26 -
Tabla 7. Metodologías analíticas para la evaluación del desempeño biológico del consorcio microbiano	- 28 -
Tabla 8. Morfotipos presentes en el consorcio microbiano	- 44 -
Tabla 9. Actividad de fosfatasa de diferentes microorganismos	- 49 -
Tabla 10. Análisis microbiológico del CM en medios diferenciales	- 50 -
Tabla 11. Resultados globales del desempeño biológico del CM en el FBR de 50 L	- 54 -
Tabla 12. Condiciones de cultivo reportadas en la literatura para cada uno de los microorganismos que conforman el CM.....	- 55 -
Tabla 13. k_La en diferentes fotobiorreactores	- 67 -
Tabla 14. Resultados globales del desempeño biológico del CM en el FBR de 150 L con diferentes tasas de dilución	- 71 -
Tabla 15. Resultados globales del desempeño biológico del CM en el FBR de 150 L con diferentes flujos de aire	- 75 -
Tabla 16. Resultados globales del desempeño biológico del CM en el FBR de 16 L con diferentes flujos de aire	- 79 -
Tabla 17. Resultados globales del desempeño biológico del CM en los tres FBR bajo condiciones controladas.....	- 83 -
Tabla 18. Resultados globales del desempeño biológico del CM en el FBR de 16 L a la intemperie.....	- 87 -
Tabla 19. Resultados globales del desempeño biológico del CM en los tres FBR a la intemperie.....	- 93 -
Tabla 20. Resultados globales del desempeño biológico del CM por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 16 L a la intemperie	- 98 -
Tabla 21. Resultados globales del desempeño biológico del CM por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 150 L a la intemperie	- 102 -
Tabla 22. Costo de consumibles para la producción del CM en el FBR de 150 L por lote y lote secuencial.....	- 106 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parámetros de diseño de biorreactores (Fuente: Posten, 2009).....	- 12 -
Figura 2. Parámetros de escalamiento y optimización de procesos en fotobiorreactores (Fuente: Barbosa, 2003)	- 14 -
Figura 3. Diagrama del FBR de 150 L: (a) vista frontal, (b) vista lateral (Escalamiento ascendente).....	- 32 -
Figura 4. Diagrama del FBR de 16 L: (a) vista frontal, (b) vista lateral (Escalamiento descendente).....	- 33 -
Figura 5. Evolución temporal de la biomasa (g L ⁻¹) y la actividad de nitrogenasa de un consorcio microbiano	- 43 -
Figura 6. Microfotografías de los morfotipos de cianobacterias, microalgas verdes y diatomeas en el CM. A, <i>Anabaena oscillarioides</i> , filamento y heterocistos intercalados. B, <i>Anabaena</i> sp., heterocisto y células vegetativas con abundante granulación. C, <i>Leptolyngbya</i> sp. D, <i>Monoraphidium</i> sp., célula vegetativa. E, <i>Monoraphidium</i> sp., vacuolas o lípidos celulares. F, <i>Chlorella</i> sp. G, <i>Nitzschia</i> sp. H, <i>Melosira varians</i> . I, <i>Cyclotella meneghiniana</i> . J, <i>Cocconeis placentula</i> . K, <i>Navicula radiosa</i> . L, <i>Fragilaria ulna</i> . M, <i>Achnanthisdium chlidanos</i>	- 45 -
Figura 7. Abundancia relativa de cada taxón encontrado en el CM tras el análisis morfológico. a-cianobacterias, b-microalgas verdes, c-diatomeas.....	- 45 -
Figura 8. Crecimiento (A) y contenido de Clorofila a (B) vs tiempo en el FBR de 50 L (n=3).....	- 53 -
Figura 9. Fotobiorreactor tipo air-lift de cara plana de 150 (A) y 16 L (B)	- 58 -
Figura 10. U_G vs t_m en los FBR de 16 y 150 L en un sistema bifásico	- 60 -
Figura 11. U_G vs ϵ en los FBR de 16, 50 y 150 L en un sistema bifásico y trifásico -	62 -
Figura 12. U_G vs k_{La} en los FBR de 16, 50 y 150 L en un sistema bifásico y trifásico.....	- 66 -
Figura 13. v_{vm} vs k_{La} en los FBR de 16, 50 y 150 L en un sistema bifásico y trifásico.....	- 66 -
Figura 14. P/V vs k_{La} en los FBR de 16, 50 y 150 L en un sistema bifásico y trifásico.....	- 68 -
Figura 15. Crecimiento del CM en un FBR de 150 L tipo air-lift de cara plana con diferentes flujos de aire (n=3).....	- 73 -
Figura 16. Crecimiento (A) y contenido de Clorofila a (B) vs tiempo en el FBR de 16 L (n=3).....	- 77 -
Figura 17. Esquema conceptual del escalamiento para la producción del consorcio microbiano fotosintético en los fotobiorreactores	- 79 -
Figura 18. Crecimiento vs tiempo en los tres FBR en condiciones controladas (n=3).....	- 81 -
Figura 19. Esquema general del bioproceso	- 84 -
Figura 20. Área semi piloto para la producción del CM (vista lateral)	- 84 -
Figura 21. Área semi piloto para la producción del CM (vista frontal)	- 84 -
Figura 22. Fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 10 L de capacidad a la intemperie (día 28)	- 88 -
Figura 23. CM creciendo en el fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 10 L a la intemperie (día 28) (40 X).....	- 88 -
Figura 24. Crecimiento vs tiempo en cultivo por lote en tres FBR a la intemperie (n=3).....	- 91 -

Figura 25. Clorofila a vs tiempo en cultivo por lote en tres FBR a la intemperie (n=3).....	- 92 -
Figura 26. Crecimiento vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 16 L a la intemperie (n=3)	- 95 -
Figura 27. Clorofila a vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 16 L a la intemperie.....	- 96 -
Figura 28. Actividad de nitrogenasa vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 16 L a la intemperie (n=3)	- 97 -
Figura 29. Crecimiento vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 150 L a la intemperie (n=3)	- 100 -
Figura 30. Clorofila a vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 150 L a la intemperie (n=3)	- 100 -
Figura 31. Actividad de nitrogenasa vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 150 L a la intemperie (n=3)	- 102 -

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la optimización de las condiciones de cultivo de un consorcio microbiano fotosintético (CM) con alta capacidad de fijación de nitrógeno, variando el flujo de alimentación de aire a un fotobiorreactor tipo *air-lift* de cara plana (FBR) de 150 L; el cual fue escalado utilizando como criterio la relación área iluminada / volumen del fotobiorreactor.

Una vez optimizadas las condiciones de operación se diseñó el bioproceso para la producción del CM bajo condiciones controladas de luz y temperatura, y a la intemperie, operando dos FBR de diferente volumen por lote y lote secuencial. Los mejores resultados de producción de biomasa se obtuvieron operando en cultivo por lote el FBR de 150 L a la intemperie con un flujo de aire de 80 L min^{-1} y un inóculo del 33 % (v/v). En estas condiciones la productividad de biomasa fue de 1.19 mg / L h y se obtuvo una actividad de nitrogenasa de $4814 \text{ nmoles eteno/ g peso seco h}$. Cuando este FBR se operó por tres ciclos en lote secuencial se logró mantener una alta producción de biomasa a la intemperie.

Dada la alta capacidad de fijación de nitrógeno del CM se consideró su uso potencial como biofertilizante, por lo que fue necesario llevar a cabo la identificación morfológica y morfométrica de los microorganismos que lo componen, así como el estudio de otras propiedades importantes del CM como la producción de promotores de crecimiento y su capacidad de solubilizar fósforo.

Se lograron identificar 2 cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno *Leptolyngbya* sp. y *Anabaena oscillarioides*, dos microalgas unicelulares *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp. y siete diatomeas *Cyclotella meneghiniana*, *Melosira varians*, *Cocconeis placentula*, *Achnantheidium chlidanos*, *Navicula radiosa*, *Fragilaria ulna* y *Nitzschia* sp. El CM mostró capacidad para producir

ácido indol acético y una actividad de fosfatasa de 27 nmoles de pNP / mg clorofila a h y 22 nmoles de bis-pNP / mg clorofila a h.

ABSTRACT

In this work we carried out the optimization of culture conditions of a photosynthetic microbial consortium (MC) with high capacity to fix nitrogen, modifying the air flow supply to a flat-plate airlift photobioreactor (PBR) of 150 L, which was scaled up using as criteria the relationship of illuminated area / volume of photobioreactor. After that, the bioprocess was designed for the production of MC under controlled conditions of light and temperature, and outdoor conditions, operating two PBR in batch and sequential batch mode.

The best results for biomass production were obtained in the PBR of 150 L in batch culture outdoors, with an air flow of 80 L min^{-1} and an inoculum of 33% (v/v), with these conditions the biomass productivity was of 1.19 mg / L h and a nitrogenase activity of $4814 \text{ nmol ethylene / g dry weight h}$, when this PBR was operated for three cycles in sequential batch culture, a high production of biomass was obtained.

Given the high nitrogen fixing capability of the MC, its potential use as biofertilizer was considered; so it was necessary to perform the morphological and morphometric identification of the microorganisms that composed it, as well as the study of other important properties of the MC as the production of growth promoters and its capability to solubilize phosphorus.

Two nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria *Leptolyngbya* sp., and *Anabaena oscillarioides*, two unicellular microalgae *Monoraphidium* sp., and *Chlorella* sp. and seven diatoms *Cyclotella meneghiniana*, *Melosira varians*, *Cocconeis placentula*, *Achnanthisidium chlidanos*, *Navicula radiosa*, *Fragilaria ulna* and *Nitzschia* sp. were identified. The MC showed the capability to produce indole acetic acid and its

phosphatase activity was 27 nmol pNP / mg chlorophyll a h and 22 nmol bis-pNP / mg chlorophyll a h.

1. INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias comprenden un grupo grande y heterogéneo de organismos fotótrofos oxigénicos de naturaleza procariótica (Brock *et al.*, 2004), poseen la capacidad de sintetizar clorofila *a*, ficoeritrina y ficocianina como pigmentos (Whitton y Potts, 2000). Las cianobacterias se pueden clasificar en diferentes Órdenes, cuyas características generales se presentan en la Tabla 1 (Whitton y Potts, 2000; Komárek, 2010).

Tabla 1. Características generales de los Órdenes de cianobacterias

ORDEN	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLOS
NO FILAMENTOSAS		
Chroococcales	Unicelulares; no forman agregados filamentosos de células unidas por la pared externa; se reproducen por fisión binaria en uno, dos o tres planos, también pueden reproducirse por gemación; raramente forman aquinetos.	<i>Anacystis nidulans</i> , <i>Synechococcus</i> sp., <i>Synechocystis</i> sp., etc.
Pleurocapsales	Unicelulares; no forman agregados filamentosos de células unidas por la pared externa; se reproducen por fisión interna múltiple con producción de células hijas más pequeñas que la original, o por una mezcla de fisión múltiple y binaria; raramente forman aquinetos.	<i>Dermocarpa</i> sp., <i>Pleurocapsa</i> sp., etc.
FILAMENTOSAS		
Oscillatoriales	Se reproducen por fisión binaria en un plano, dando lugar a un tricoma (cadena de células); los tricomas no forman heterocistos.	<i>Pseudoanabaena</i> sp., <i>Spirulina</i> sp., etc.
Nostocales	Se reproducen por fisión binaria en un plano dando lugar a un tricoma (cadena de células); los tricomas forman una o más células diferenciadas (heterocistos). Cuando la concentración de nitrógeno en el medio es baja; algunos forman aquinetos.	<i>Anabaena azollae</i> , <i>Calothrix</i> sp., <i>Nodularia</i> <i>chucula</i> , <i>Nostoc</i> sp., <i>Scytonema</i> sp., etc.

Fuente: Whitton y Potts (2000)

Las cianobacterias viven en forma libre o como simbioses con algún tipo de planta, también en la naturaleza las podemos encontrar formando consorcios, que consisten en un sistema de dos o más miembros donde cada organismo realiza algo en beneficio de otro (Brock *et al.*, 2004). Los consorcios microbianos resultan

clave en los ciclos biogeoquímicos, lo que les confiere importancia ecológica dada la gran cantidad de estrategias metabólicas que pueden desarrollar (Grewe y Pulz, 2012). Desde el punto de vista tecnológico, los consorcios microbianos se han utilizado para la remoción de metales pesados y de contaminantes orgánicos (Muñoz *et al.*, 2006) presentes en aguas residuales, para la obtención de biodiesel (Hena *et al.*, 2015) y de energía eléctrica (Gajda *et al.*, 2015), y para la conversión de carbono y generación de biogás (Vasseur *et al.*, 2012); puesto que han demostrado mayor eficiencia de síntesis de productos y conversión de nutrientes a menor costo comparado con la utilización de cultivos puros (Muñoz *et al.*, 2006; Vasseur *et al.*, 2012; Hena *et al.*, 2015).

1.1 Distribución e importancia de las cianobacterias

Las cianobacterias tienen una distribución muy extensa en la naturaleza, en el suelo y en el hábitat marino. En general, son más tolerantes a los ambientes extremos que las algas eucarióticas y a menudo son los únicos organismos fotosintéticos presentes en los manantiales de agua caliente, lagos salinos y otros ambientes extremos. Se encuentran en la superficie de las rocas, o en el suelo; en los desiertos permanecen en estado latente durante la mayor parte del año y crecen en el invierno (Brock, 1993; Kumar *et al.* 2011; Singh *et al.* 2016). Esta distribución amplia de las cianobacterias puede ser debido a la adaptación morfofuncional de las especies (Srivastava *et al.*, 2007).

Las cianobacterias son de gran importancia ecológica y económica (Brock, 1993; Thajuddin y Subramanian, 2005), debido a que son productores primarios y un gran número de ellas son capaces de fijar nitrógeno en ambientes acuáticos y terrestres (Venkataraman, 1981), por lo que son ampliamente utilizadas como biofertilizantes en países tropicales, particularmente en cultivos de arroz (Goyal,

2002; Prasanna *et al.* 2015; Kantachote *et al.* 2016). También son importantes porque constituyen un valioso recurso de aplicación en las industrias de alimentos, médica, de los energéticos, agrícola y para combatir la contaminación. En los últimos años han habido grandes avances en la biotecnología de cianobacterias (Thajuddin y Subramanian, 2005), algunos ejemplos de compuestos obtenidos de cianobacterias y microalgas se muestran en la Tabla 2 (Barbosa, 2003, Carvalho *et al.*, 2006).

Tabla 2. Compuestos producidos por microalgas y cianobacterias

Microorganismo	Producto	Aplicaciones
<i>Spirulina</i> sp.	Biomasa	Alimentos funcionales y para la salud Alimentación animal Acuicultura
<i>Chlorella</i> sp. <i>Hematococcus pluvialis</i> <i>Dunaliella salina</i> <i>Scenedesmus</i> sp. <i>Spirulina platensis</i>	Colorantes y antioxidantes: Xantófilas (ej. astaxantina) β -caroteno Luteína Ficocianina	Alimentos Suplementos alimenticios para animales Cosméticos
<i>Euglena gracilis</i> <i>Isochrysis galbana</i> <i>Cryptocodinium cohnii</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Ácidos grasos: Ácido araquidónico Ácido docosahexapentanoico Ácido eicosapentanoico	Suplementos alimenticios Medicina
<i>Gloeotrichia natans</i>	Polímeros: Polisacáridos Ácido β -polihidroxitirato	Cosméticos Medicina

Fuente: Barbosa (2003), Carvalho *et al.* (2006)

Bajo ciertas condiciones de cultivo las cianobacterias pueden producir exopolisacáridos (EPS por sus siglas en inglés); por ejemplo, en *Gloeotrichia natans*, utilizada como biofertilizante, se ha descrito un incremento en EPS y de su crecimiento cuando es cultivada a 38 °C, pH 8 y sin la adición de carbono inorgánico al medio de cultivo. Sin embargo, el suministro de dióxido de carbono (CO₂) al medio en algunas cianobacterias produce un incremento de biomasa y en ambientes acuáticos este incremento depende de muchos parámetros que

incluyen la baja velocidad de difusión del CO₂ en el agua, pH, turbulencia y densidad celular (Morales *et al.*, 2002). Para que estos organismos puedan ser explotados a gran escala y con la finalidad de mejorar la tecnología de cultivo, y desarrollar protocolos nuevos económicamente factibles para la producción de inóculos de calidad, se han buscado alternativas como son: producción de biomasa bajo condiciones controladas en fotobiorreactores (FBR) cerrados, optimización del medio de cultivo para mejorar el crecimiento del organismo a un costo menor, y el diseño de FBR para favorecer el mezclado, pH y temperatura óptimos (Contreras *et al.*, 2003, Innok *et al.*, 2009).

Otra alternativa que se ha planteado para la generación de productos de interés biotecnológico a gran escala a partir de cianobacterias, ha sido el uso de consorcios microbianos ya que su producción con frecuencia es más factible que el usar cultivos puros (Höffner y Barton, 2014). Además, muchos microorganismos en ambientes naturales no viven aislados, sino que forman parte de consorcios que tienen una dinámica poblacional interna siendo la competencia por los recursos y la cooperación entre los mismos lo que determina el éxito de su desempeño biotecnológico (Subashchandrabose *et al.*, 2011).

1.2 Fijación de nitrógeno

Debido a que las plantas y los organismos eucariotas no son capaces de utilizar el nitrógeno (N₂) presente en la atmósfera de nuestro planeta para satisfacer sus requerimientos biológicos, se auxilian en procesos mediante los cuales el N₂ es convertido en especies químicas que puedan ser fácilmente absorbidas y utilizadas por ellos (Thayumanavan y Parvathy, 2002).

Los procesos globales de fijación de N₂ son: fijación atmosférica, fijación industrial, expulsión volcánica de amoníaco (NH₃) y fijación biológica

(Thayumanavan y Parvathy, 2002). Por ser el interés del presente estudio, a continuación se describe el último proceso.

1.3 Estrategias que tienen las cianobacterias para fijar nitrógeno: desacoplamiento y heterocistos

La utilización de nitrógeno atmosférico se denomina “fijación de nitrógeno” y es una propiedad que poseen sólo algunas bacterias y cianobacterias, actualmente no se conoce organismo eucarionte capaz de realizar esta función. Existen algunas bacterias llamadas simbióticas, que fijan N_2 sólo cuando están presentes en los nódulos o en las raíces de algunas plantas (Brock, 1993).

Los requerimientos básicos para la fijación biológica de nitrógeno son: un complejo enzimático denominado Nitrogenasa, un agente reductor, adenosin trifosfato (ATP) y baja tensión de oxígeno (O_2).

1.3.1 Complejo Nitrogenasa

La reducción de N_2 a amonio (NH_4^+) es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa, el cual es muy similar en cuanto a composición y función en todos los organismos procarióticos (Thayumanavan y Parvathy, 2002). Este complejo consiste de dos proteínas: la ferro-proteína (Fe-proteína) y la molibdo ferro-proteína (MoFe-proteína).

- Ferro-proteína (dinitrogenasa reductasa)

Esta proteína es extremadamente sensible al oxígeno, posee un peso molecular de 60 kDa aproximadamente. Es un dímero con subunidades idénticas unidas mediante un puente sencillo 4Fe:4S, cuya estructura dimérica mejora su estabilidad mediante interacciones salinas o hidrofóbicas.

La Fe-proteína tiene dos características funcionales principales, una es su enlace al ATP y la segunda un sitio funcional que es el grupo 4Fe:4S. La evidencia

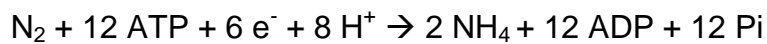
disponible indica que la Fe-proteína está involucrada en la hidrólisis de ATP, que es necesario para la transferencia de electrones en el proceso de fijación de nitrógeno (Thayumanavan y Parvathy, 2002).

- Molibdo ferro-proteína (MoFe-p)

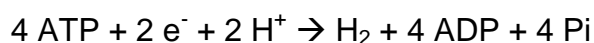
La MoFe-proteína (dinitrogenasa) está compuesta por dos cadenas polipeptídicas diferentes; es un tetrámero con un peso molecular total de aproximadamente 240 kDa; tiene dos grupos de centros metálicos: el grupo P y el grupo M (MoFe-cofactor). El grupo M contiene 1Mo:7Fe:9S y una molécula de homocitrato. El grupo P contiene 4Fe:4S, los cuales están conectados por el grupo tiol de la cadena lateral de los residuos de cisteína y un enlace disulfuro entre dos grupos de azufre inorgánico. En la MoFe-p se lleva a cabo la unión del sustrato y la reducción del nitrógeno (Thayumanavan y Parvathy, 2002).

Las reacciones totales catalizadas por el complejo nitrogenasa son:

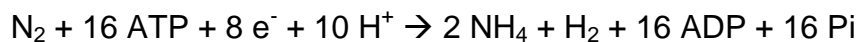
- a. Síntesis de amonio



- b. Formación de hidrógeno



Los requerimientos netos son:



Las cianobacterias filamentosas de los géneros *Anabaena* y *Nostoc* protegen su complejo nitrogenasa por diferenciación de aproximadamente el 5-10 % de sus células vegetativas llamadas heterocistos (White, 2000). Los heterocistos se encuentran distribuidos a lo largo del filamento o al final del mismo y su función es proveer un ambiente anaerobio al complejo nitrogenasa, y suministrar nitrógeno

combinado a las células vegetativas del resto del filamento (Adams y Duggan, 1999).

1.3.2 Heterocisto (estructura y función)

Los heterocistos son los sitios principales de fijación de nitrógeno (Brock, 1993), tienen conexiones intercelulares con las células vegetativas adyacentes y existe un intercambio de materiales entre ellas que son producto de la fotosíntesis. La formación de heterocistos es una característica de cianobacterias que pertenecen al Orden Nostocales.

En el heterocisto, el complejo nitrogenasa reduce N_2 a NH_4^+ , el cual es incorporado a los aminoácidos y a otros compuestos nitrogenados a través de glutamina por acción de la glutamina sintetasa. La glutamina entra en las células vegetativas donde sirve como fuente de nitrógeno para el crecimiento. La célula vegetativa fija CO_2 para producir carbohidratos mediante el ciclo de Calvin. Algunos de los carbohidratos entran al heterocisto, donde sirven como fuente de carbono y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). El NADPH reduce el complejo nitrogenasa vía ferredoxina: NADP óxido reductasa y ferredoxina. El ATP se produce por fotofosforilación cíclica en el heterocisto utilizando el fotosistema I (White, 2000).

Los heterocistos tienen baja concentración de ficobilina que es un pigmento accesorio fotosintético y carecen de fotosistema II, que es donde se produce oxígeno. Debido a la naturaleza reductiva de la fijación de nitrógeno y a la sensibilidad del complejo enzimático nitrogenasa al oxígeno, parece probable que el heterocisto, al mantener un ambiente anaerobio, haga posible la estabilización del sistema fijador de nitrógeno en organismos que no son sólo aerobios, sino también productores de oxígeno. Así mismo, es posible que algunas

cianobacterias filamentosas no heterocíticas, produzcan nitrogenasa y fijen nitrógeno en las células vegetativas normales si crecen en forma anaerobia (Brock, 1993).

Para crear un ambiente anaerobio para el complejo enzimático nitrogenasa, el heterocisto adquiere más capas en la pared celular, las cuales disminuyen la difusión de gases incluyendo el oxígeno. Contiene tres capas extras en la pared celular: la más interna consiste en una capa laminada de glicolípidos, la siguiente en una capa homogénea de polisacárido y la externa es una capa fibrosa que probablemente consiste de hebras del mismo polisacárido (Adams y Duggan, 1999).

El desarrollo de un heterocisto representa un gasto metabólico considerable para la célula y una pérdida de la capacidad de división, por lo que resulta esencial que únicamente las células vegetativas necesarias se diferencien en heterocistos. Esto requiere flexibilidad en el proceso de desarrollo, por lo que se presenta una etapa intermedia donde se forma un preheterocisto, el cual tiene la capacidad de desdiferenciarse bajo las condiciones apropiadas. El desarrollo de preheterocistos en cianobacterias como *Anabaena* y *Nostoc* creciendo en un medio libre de nitrógeno, toma aproximadamente de 12 a 15 h para diferenciar del 5 al 10% del total de las células; el proceso de desarrollo de heterocistos maduros toma aproximadamente un ciclo celular (25-30 h) (Adams y Duggan, 1999).

El gen más importante y esencial en la regulación del desarrollo del heterocisto es el *het R* el cual fue identificado en cepas mutantes de *Anabaena* PCC7120 (Wolk, 1996). La presencia de múltiples copias de *het R* en cepas silvestres, estimula la formación de heterocistos cuando el nitrato está presente, mientras que la formación de agrupaciones de 2 a 5 heterocistos se lleva a cabo en su ausencia.

En presencia de nitratos, nitritos o amonio, la transcripción del gen *het R* es baja y al remover la fuente de nitrógeno del medio, inicia la inducción de *het R* después de 2 h y hasta las 3.5 h su transcripción aumenta. La expresión de *het R* requiere de una proteína funcional *Het R*, lo que implica que el gen es autorregulado positivamente. La proteína *Het R* actúa como una serin proteasa que requiere Ca^{++} *in vivo*, esta proteína degrada represores de genes que activan y activadores de genes que apagan la diferenciación del heterocisto.

La formación de heterocistos contiguos en un mismo filamento puede ser inducido por múltiples copias de *het R*, *het P*, 7-azatriptófano, β -2-trienilamina o aminoácidos análogos, también por AMP cíclico o por la presencia de una baja concentración de rifampicina en un medio con agar (Wolk, 1996).

1.4 Fotobiorreactores

Una vez que se cuenta con la cepa de interés y se han definido los productos que se desean obtener, se lleva a cabo el desarrollo de bioprocesos para establecer el enlace entre el descubrimiento y la comercialización de bioproductos. El diseño de reactores y la optimización del bioproceso son pasos esenciales para que el nuevo producto sea vendido.

Los sistemas de cultivo pueden variar dependiendo del producto deseado y de la cepa (Barbosa, 2003); existen dos sistemas básicos para la producción de microorganismos fotoautotróficos (Grobbelar, 2000) y son:

1.4.1 Sistemas abiertos

En ellos el cultivo está expuesto a la atmósfera, un ejemplo de éstos son las lagunas abiertas, los sistemas inclinados, lagunas circulares y las de tipo carrusel (Tredici, 2004).

La mayoría de los sistemas de producción industrial de biomasa de microalgas construidos antes de los años 90, fueron esencialmente sistemas abiertos tipo carrusel, constituidos por canales poco profundos en forma de circuito cerrado, en los que el medio de cultivo se impulsa mediante paletas rotatorias. Estos sistemas generalmente requieren de grandes áreas de terreno (500-5000 m²), pero tienen como ventaja su bajo costo de producción de biomasa algal en algunas zonas geográficas específicas. Algunas de las desventajas que presentan este tipo de sistemas son: baja densidad celular, baja productividad, fácil contaminación, recuperación costosa del producto a partir de medios diluidos y dificultad para controlar la temperatura (Contreras *et al.*, 2003).

1.4.2 Sistemas cerrados (Fotobiorreactores)

En ellos, el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera, estos sistemas han sido evaluados en sus diversas configuraciones con respecto a su potencial de productividad y factibilidad económica (Tredici, 2004).

Los fotobiorreactores se pueden construir con materiales transparentes como vidrio y policarbonato, entre otros. En la última década los fotobiorreactores tubulares y de placas planas han recibido mucha atención ya que permiten obtener cultivos de alta densidad celular en comparación con los sistemas convencionales de carrusel. Lo anterior tiene ventajas como: la facilidad para cosechar la biomasa, mantenimiento del cultivo sin contaminación, mayor control de las condiciones de cultivo y menor inversión de capital en la construcción y operación del fotobiorreactor (Contreras *et al.*, 2003). En la Tabla 3 se mencionan las tres configuraciones principales de fotobiorreactores reportadas en la literatura y algunas ventajas y limitaciones que presentan para su operación y construcción (Ugwu *et al.*, 2008).

Tabla 3. Ventajas y limitaciones de los fotobiorreactores cerrados

Sistemas de cultivo (fotobiorreactor)	Ventajas	Limitaciones
Columna vertical	Alta transferencia de masa, buen mezclado con bajo esfuerzo de corte, bajo consumo de energía, alto potencial para escalamiento, utilizado para inmovilización de algas, reduce la fotoinhibición	Pequeña área de superficie iluminada, su construcción requiere materiales caros, disminución del área de superficie iluminada al escalar el FBR
"Flat-plate"	Gran área de superficie iluminada, adecuado para cultivos al aire libre, buena trayectoria de la luz ("light-path"), buena productividad de biomasa, relativamente barato, fácil de limpiar, baja acumulación de oxígeno	Su escalamiento requiere muchos compartimientos y material de soporte, control difícil de la temperatura del cultivo, cierto grado de crecimiento celular en la pared, posibilidad de estrés hidrodinámico en algunas cepas de algas
Tubular	Gran área de superficie iluminada, adecuado para cultivos al aire libre, buena productividad de biomasa, relativamente barato	Gradientes de pH, oxígeno disuelto y CO ₂ a lo largo del tubo, cierto grado de crecimiento celular en la pared, requiere gran espacio de terreno para su escalamiento

Fuente: Ugwu *et al.* (2008)

La biotecnología de microalgas ha progresado a un ritmo relativamente lento, a pesar de su reconocida utilidad como fuente de compuestos de alto valor agregado para las industrias alimentaria y farmacéutica (Barbosa *et al.*, 2003). Un factor limitante de dicho progreso, ha sido la poca eficiencia de las técnicas de cultivo de microalgas a gran escala. Los requerimientos de las microalgas han llevado a poner énfasis en el diseño de fotobiorreactores; sin embargo, para poder desarrollar sistemas eficientes a gran escala y de bajo costo, se deben resolver aún muchos problemas ingenieriles (Barbosa *et al.*, 2003; Janssen *et al.*, 2003).

Para diseñar un fotobiorreactor se deben tomar en cuenta varias recomendaciones, además de considerar diferentes configuraciones y tamaños dependiendo del propósito del reactor e incluso, dependiendo de la disciplina de investigación en el cual será empleado (Contreras *et al.*, 2003; Posten, 2009).

Recomendaciones:

1. La trayectoria de la luz debe ser pequeña (2.5 cm)
2. Mantener una alta densidad celular ($> 8-15 \text{ g L}^{-1}$)
3. Aplicar un mezclado vigoroso para asegurar ciclos de luz/oscuridad (L/O) de alta frecuencia
4. Usar tramos cortos de tubería (20-30 m) para evitar inhibición del crecimiento por acumulación de O_2 en los fotobiorreactores tubulares
5. Mantener temperatura y pH óptimos

En la figura 1 se muestra un diagrama esquemático de parámetros importantes en el diseño de un biorreactor (Posten, 2009).

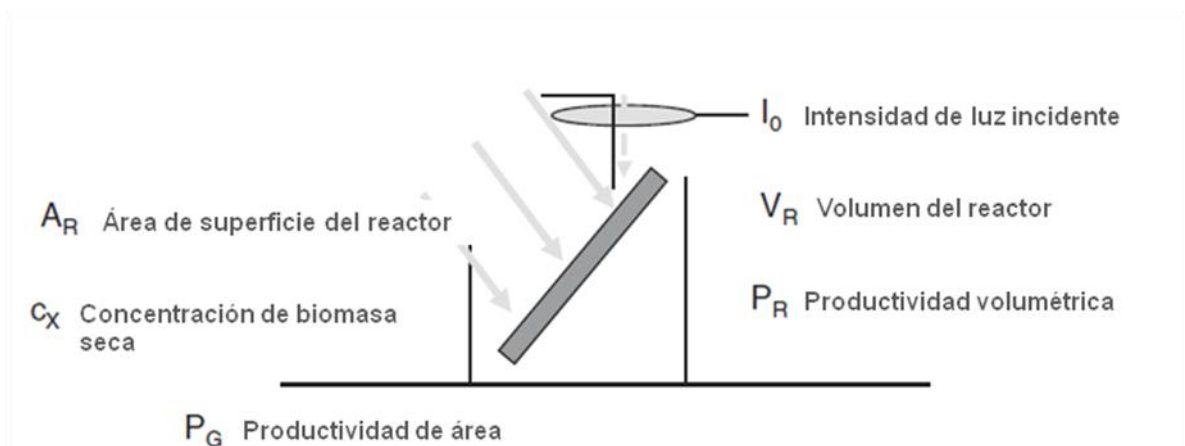


Figura 1. Parámetros de diseño de biorreactores (Fuente: Posten, 2009)

Donde:

Volumen del reactor [V_R (L)]: El volumen total de trabajo incluye las fases líquida y gaseosa.

Área de superficie del reactor [A_R (m^2 o ha)]: El área de la superficie total de la parte transparente del reactor determina la cantidad de luz que puede entrar eventualmente al reactor.

Productividad volumétrica [P_R ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$)]: Es la medida del producto formado por volumen de reactor en un intervalo de tiempo. Los resultados de experimentos a escala laboratorio se reportan en base volumétrica. La productividad volumétrica es un valor importante para la producción de compuestos de alto valor como fármacos. El volumen de operación contribuye al costo total del bioproceso.

Productividad de área [P_G ($\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$)]: La productividad de área es el parámetro más importante para evaluar plantas industriales de fotobiorreactores de mayor capacidad. Este parámetro puede ser utilizado como criterio para el escalamiento de fotobiorreactores considerando la eficiencia de utilización de energía, para la obtención de biomasa o producto, a partir de la luz incidente al fotobiorreactor en una cierta área.

Concentración de biomasa seca [C_x (g L^{-1})]: Cantidad de biomasa por unidad de tiempo.

Irradiación [I_0 ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)]: La irradiación está representada como densidad de flujo fotónico. Para el cálculo de grandes áreas, ej. para la viabilidad de estudios de producción de bio-energía, la irradiación está representada como densidad de potencia (W m^{-2}). El índice cero (0) hace referencia al valor de la superficie. La eficiencia de fotoconversión referida a la fracción de energía solar que es convertida a energía química en un fotobioproceso, tiene un valor teórico reportado de 9% del total de la energía solar.

Mediante la biotecnología de microalgas es posible lograr cultivos de alta densidad celular si se emplea un diseño adecuado de reactor y se optimiza el proceso. Por esta razón es importante poner énfasis en los parámetros más críticos de escalamiento y operación como son: la luz, transferencia de masa, esfuerzo de corte y el mezclado. Estos parámetros están interrelacionados y

determinan la productividad y eficiencia del sistema de cultivo (Fig. 2) (Barbosa, 2003).

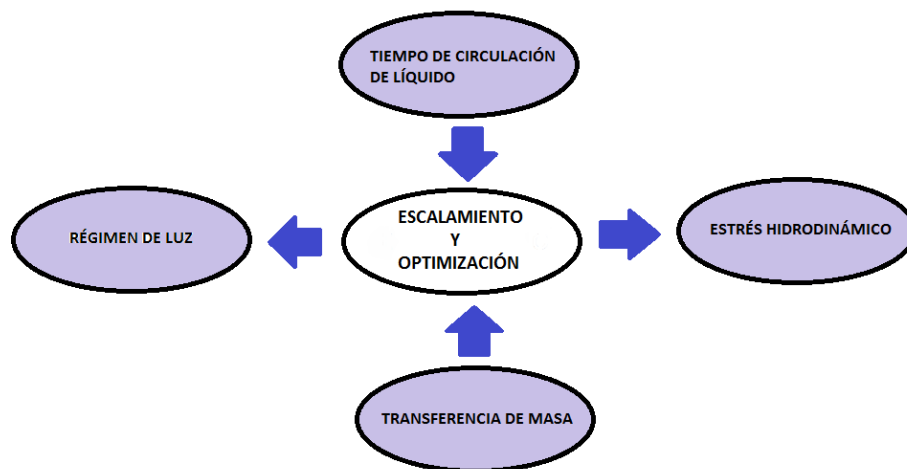


Figura 2. Parámetros de escalamiento y optimización de procesos en fotobiorreactores (Fuente: Barbosa, 2003)

Para realizar la optimización de los sistemas de producción de microalgas es necesario considerar aspectos biológicos y tecnológicos, tales como (Grobbelar, 2000):

1. El proceso de captura de energía y fotosíntesis
2. Selección de la cepa
 - Tolerancia a CO₂
 - Tolerancia a temperatura
 - Facilidad de cultivar en biorreactores específicos
 - Valor agregado (suplemento alimenticio, bioenergía, pigmentos, etc.)
 - Requerimiento de macro y micronutrientes necesarios para el crecimiento específico de la cepa seleccionada
 - Excreción de autoinhibidores
 - Cosecha y procesamiento “down-stream”
 - Potencial de manipulación en términos de ingeniería genética

3. Tipo de reactor y diseño

- Profundidad del cultivo
- Turbulencia o mezclado
- Contenido de nutrientes y suministro; incluyendo intercambio de gas (ej. el suministro de CO₂)
- Procedimiento de cultivo: lote, varios tipos de continuo o semi-continuo y procesos multietapa
- Concentración de biomasa y densidad

1.4.3 Fotobiorreactores *flat-panel*

Uno de los principales parámetros considerados para el diseño de reactores es la transferencia de la luz, para lo cual es necesario aumentar la relación área iluminada-volumen de operación (A/V). Para cumplir con lo anterior, fueron diseñados específicamente los fotobiorreactores de cara plana (*flat-panel*) que favorecen el uso óptimo de luz por microalgas y cianobacterias; sin embargo, el escalamiento utilizando este parámetro aún presenta diversas limitaciones, ya que no existe un criterio universal que determine las características óptimas de este tipo de reactores (Tredici *et al.*, 1991; Pulz, 1992; Kumar *et al.*, 2011). Entre los criterios más utilizados para escalar los fotobiorreactores de cara plana se encuentran: el régimen de luz, la transferencia de masa, la relación A/V y el tiempo de mezclado (Reyna-Velarde *et al.*, 2010).

En la Tabla 4 se presentan algunos criterios de escalamiento reportados en la literatura para fotobiorreactores *flat-panel*.

Tabla 4. Criterios de escalamiento para fotobiorreactores flat-panel

Tipo de FBR	Volumen Criterio de escalamiento y optimización	Cepa Bioproducto	Referencia
“Flat-panel “	17 y 90 L Relación del área de la sección transversal (Ad/Ar) (0.4) Velocidad superficial del gas (U _{sg}) (0.4 cm s ⁻¹)	<i>Haematococcus pluvialis</i> Biomasa	Issarapayup <i>et al.</i> , 2009
Columna anular	120 L “Light path” 5 cm	<i>Tetraselmis</i> sp. Biomasa	Zittelli <i>et al.</i> , 2006
“Flat- panel” (thin layer)	400L “Light path “0.6 cm	<i>Chlorella</i> sp. Biomasa	Doucha <i>et al.</i> , 2005
“Vertical flat- panel”	8.9 L Altura del líquido (56 y 94 cm) “Light path” (1.5- 2.5 cm)	<i>Synechocystis aquatilis</i> SI-2 Biomasa	Zhang <i>et al.</i> , 2002a
“Vertical flat- panel”	500 a 1000 L “Light path” (10 cm)	<i>Nannochloropsis</i> sp. Biomasa y ácido eicosapentanoico	Chen-Wu <i>et al.</i> , 2001
“Vertical flat- panel”	200 L “Light path” (1.3 a 17 cm) Óptimo 10 cm	<i>Nannochloropsis</i> sp. Biomasa y ácido eicosapentanoico	Richmond <i>y</i> Chen-Wu, 2001
“Vertical flat- panel”	192 L “Light path” (1-3 cm) Altura del reactor (94-165 cm)	<i>Synechocystis aquatilis</i> SI-2 Biomasa	Zhang <i>et al.</i> , 2001
Tubular	146 L “Light path” (10 cm)	<i>Arthrospira</i> sp. Biomasa	Carlozzi, 2000
“Flat inclined modular”	6- 50 L “Light path” (1.3-10.4 cm) Inclinación 30° y 60° brinda mayor A/V	<i>Anabaena siamensis</i> <i>Spirulina platensis</i> <i>Monodus subterraneus</i> Biomasa	Hu <i>et al.</i> , 1996

Una estrategia desarrollada para favorecer la producción de biomasa de cianobacterias a gran escala y que sea económicamente factible es operar los fotobiorreactores en régimen semicontinuo a la intemperie, sin embargo el ciclo de luz no puede ser controlado en esta condición, lo que afecta su productividad (Chen *et al.* 2011). Este tipo de sistema de cultivo (cultivo semicontinuo del tipo cultivo por lote secuencial o lote repetido) ofrece ventajas tales como obtener una

proporción elevada y constante de inóculo, altas tasas de crecimiento, se prolonga la operación de los reactores y con ello se reducen los costos de operación (Reichert *et al.* 2006). Por lo anteriormente mencionado, diversos autores han evaluado diferentes diseños de fotobiorreactores para asegurar el uso eficiente de la luz a la intemperie en cultivo semicontinuo (Innok *et al.* 2009). Existen actualmente pocos informes sobre el uso del cultivo semicontinuo a la intemperie para la producción de cianobacterias y microalgas, por lo que se requiere llevar a cabo una mayor cantidad de estudios científicos con la finalidad de determinar las condiciones más adecuadas para la producción de biomasa microalgal, y de otros productos de interés biotecnológico.

2. ANTECEDENTES

México presenta una gran diversidad de climas a lo largo del año, lo que favorece el cultivo de una amplia variedad de plantas, semillas y frutos, utilizados para consumo humano, de ganado o como materia prima para diferentes industrias; por tal motivo se han buscado diversas estrategias para mejorar la productividad agrícola, entre ellas el uso de fertilizantes químicos y pesticidas, pero el uso indiscriminado de éstos ha traído consecuencias ambientales como son: acidificación de suelos, daños a la salud, eutrofización de cuerpos de agua, calentamiento global, etc. (Aguirre, 2001, Muñoz *et al.*, 2004).

Por lo anterior, se han buscado alternativas de fertilización no perjudiciales y amigables al ambiente como son los biofertilizantes, los cuales se definen como una preparación de microorganismos que adicionan, conservan y movilizan los nutrimentos en el suelo (Goyal, 2002). Los biofertilizantes se pueden clasificar de acuerdo a su acción en el proceso de crecimiento vegetal como (Kannaiyan,

2002b): microorganismos solubilizadores de fosfato (PO_4^{-3}), rizobacterias promotoras del crecimiento, micorrizas y microorganismos fijadores de N_2 .

Entre los microorganismos fijadores de nitrógeno podemos incluir a las cianobacterias, las cuales son microorganismos fotosintéticos de importancia biológica y ecológica, que juegan un papel fundamental en la colonización y establecimiento de la flora microbiana en el suelo, también pueden proveer beneficios a la planta suministrando elementos esenciales como nitrógeno y fósforo (Goyal, 2002). Estudios reportados en la literatura han demostrado que la capacidad de fijación de nitrógeno de las cianobacterias, no es el único factor que contribuye al crecimiento y mejora de las características fenológicas de la planta, también la presencia de fitohormonas como auxinas, citocininas, ácido abscísico, giberelinas y etileno, tienen un papel importante en este proceso (Hashtroudi *et al.*, 2012); es por esto que la biomasa de cianobacterias es ampliamente utilizada como biofertilizante.

Ejemplos de algunos sistemas biofertilizantes basados en cianobacterias se mencionan en la Tabla 5.

Tabla 5. Sistemas biofertilizantes

Sistema	Cultivo	Aporte	Referencia
Simbiosis <i>Azolla-Anabaena</i>	Arroz	Nitrógeno	Kannaiyan (1989)
Inóculo compuesto de cianobacterias	Arroz	Nitrógeno	Kannaiyan (1990)
Cianobacterias inmovilizadas	Arroz	Nitrógeno	Kannaiyan (2002a)
<i>Calothrix ghosei</i> , <i>Hapalosiphon intricatus</i> y <i>Nostoc</i> sp.	Trigo	Nitrógeno y promotores de crecimiento vegetal	Karthikeyan <i>et al.</i> (2007)
Cultivo mixto de cianobacterias fijadoras de nitrógeno	Arroz	Nitrógeno	Pereira <i>et al.</i> (2009)
Cultivo mixto de cianobacterias fijadoras de nitrógeno	Trigo	Nitrógeno y promotores de crecimiento vegetal	Nain <i>et al.</i> (2010)
<i>Tolypothrix tenuis</i> , <i>Microchaete tenera</i> y <i>Nostoc</i> sp.	Maíz	Nitrógeno y promotores de crecimiento vegetal	Osman <i>et al.</i> (2010)
<i>Nostoc entophytum</i> y <i>Oscillatoria angustissima</i>	Chícharo	Nitrógeno y promotores de crecimiento vegetal	Osman <i>et al.</i> (2010)
<i>Chlorella sorokiniana</i> y <i>Anabaena brasilense</i>	Suelos áridos	Aumento de fertilidad	Trejo <i>et al.</i> (2012)

A pesar de la reconocida utilidad de las cianobacterias y microalgas como posibles biofertilizantes para diferentes cultivos agrícolas, actualmente no existe una empresa mexicana que se dedique a su producción a gran escala, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas tecnologías para su desarrollo y comercialización.

Ante la necesidad mencionada previamente, en el grupo de trabajo de Biotecnología de Microalgas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería se aisló, propagó y caracterizó un consorcio microbiano fotosintético (CM), aislado

de suelo, agua de anegamiento y tallo de plantas en un campo arrocero ubicado en la comunidad de Alpuyecá, Estado de Morelos, México (propiedad de la Empresa Arrocera de Morelos S.A de C.V.). Se promovió el crecimiento de organismos fijadores de nitrógeno presentes en las muestras mediante su cultivo en fotobiorreactores de diferentes escalas y geometrías, utilizando un medio mineral sin fuente de nitrógeno (BG-11₀), con la finalidad de su posterior aplicación como biofertilizante. El CM seleccionado con base en su crecimiento y capacidad de fijación de nitrógeno, fue crecido en un fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 11 L a una temperatura de 21 °C, una cantidad de luz de 80 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un flujo de aire de 1vvm (Reyna-Velarde, 2010).

Una vez establecido el CM en el fotobiorreactor de 11 L, se llevó a cabo la identificación de los microorganismos que conforman el consorcio microbiano fotosintético mediante el análisis molecular de un fragmento del gen 16S rDNA, analizando 44 clonas a partir de las cuales por análisis bioinformático fue posible identificar aproximadamente 12 microorganismos diferentes en el CM pertenecientes a los phyla Proteobacteria (*Rhodobacter* sp., *Devosia insulae*, *Pedomicrobium americanum*, *Alpha proteobacteria*, *Aquaspirillum delicatum*, *Methylibium petroleiphilum* y *Nannocystis* sp.), Bacteroidetes (*Flavobacterium* sp. y *Flavobacterium aquatile*), y Cyanobacteria (*Aphanizomenon aphanizomenoides*, *Leptolyngbya* sp. y *Anabaena oscillarioides*) (Hernández, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

Una vez establecido el CM y conocidos los organismos que lo conforman, se hace necesario llevar a cabo la optimización de las condiciones para su cultivo, que favorezcan el crecimiento de los organismos fijadores de nitrógeno *Anabaena oscillarioides*, *Aphanizomenon aphanizomenoides* y *Leptolyngbya*, con la finalidad de mejorar su producción a gran escala.

4. HIPÓTESIS

- La variación del flujo de aire suministrado al fotobiorreactor tipo *air-lift* de cara plana de 150 L, afectará la productividad y fijación biológica de nitrógeno del CM.
- El cultivo por lote secuencial en un fotobiorreactor tipo *air-lift* de cara plana, favorecerá la productividad de biomasa y la fijación biológica de nitrógeno del CM en comparación con el cultivo por lote.

5. OBJETIVOS

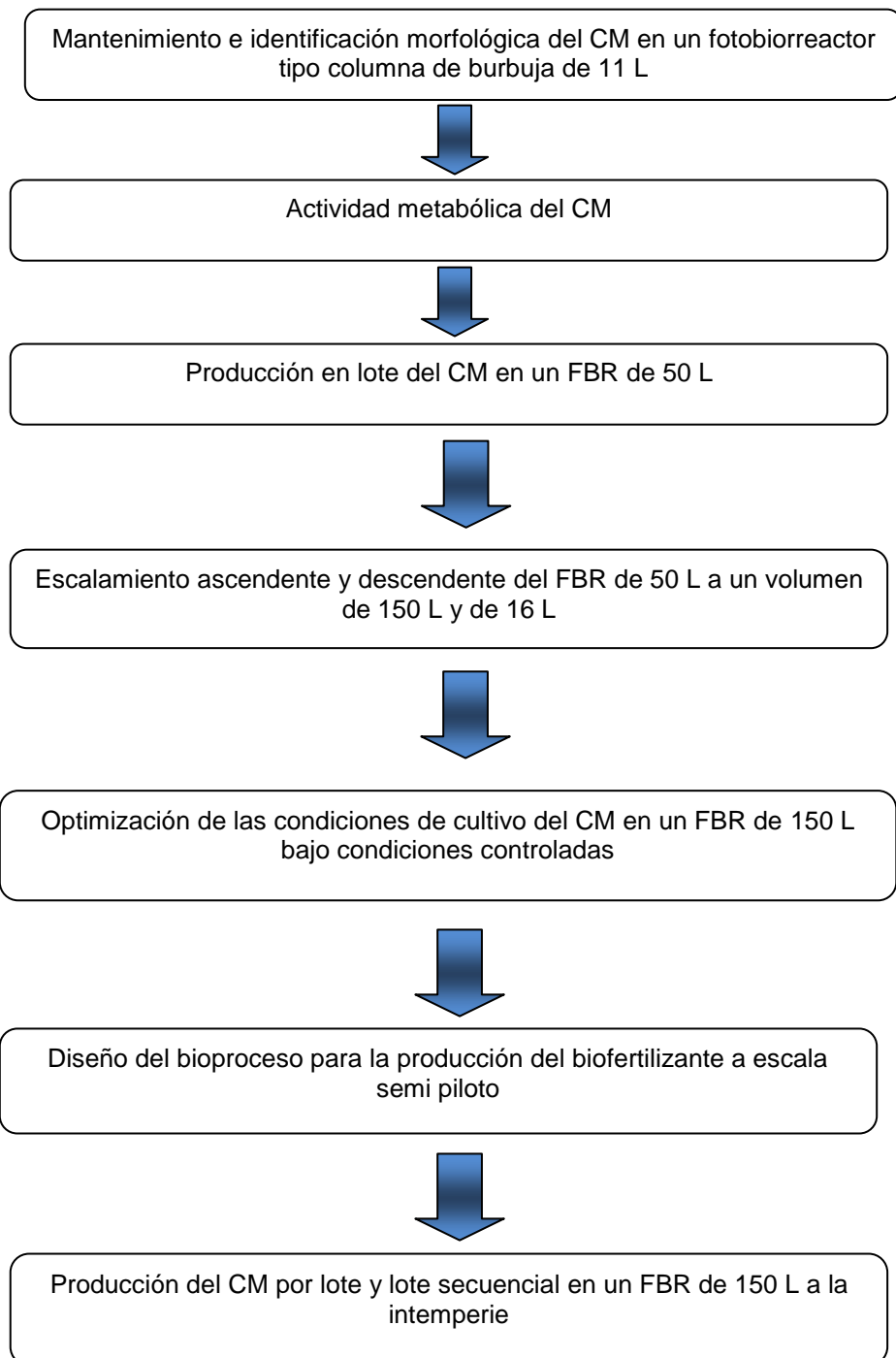
5.1 General

Optimizar las condiciones de cultivo que favorezcan la fijación de nitrógeno del CM, su posterior escalamiento y producción en un fotobiorreactor tipo *air-lift* de cara plana (FBR) de 150 L.

5.2 Específicos

- Identificar morfológicamente los componentes biológicos del CM.
- Estudiar los parámetros que afectan la fijación de nitrógeno en el CM durante su crecimiento en lote.
- Escalar el fotobiorreactor de cara plana tipo *air-lift* de 50 L a un volumen de 150 L.
- Optimizar las condiciones de cultivo que favorezcan la fijación de nitrógeno del CM.
- Diseñar el bioproceso a escala semi-piloto para la producción del biofertilizante.
- Producir el CM en un FBR de 150 L.

6. PLAN DE TRABAJO



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 ETAPA 1. Mantenimiento e identificación morfológica del CM en un fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 11 L

La propagación y mantenimiento del consorcio microbiano (CM) se realizó en un fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 11 L de capacidad total, y se evaluó su desempeño biológico en cultivo por lote con una duración de 14 días, mediante la determinación de la cantidad de biomasa en base seca (Tredici *et al.*, 1991) y la actividad de nitrogenasa mediante el ensayo de reducción de acetileno (Venkataraman, 1981). Las condiciones del experimento fueron intensidad de luz de $80 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, aireación de 11 L min^{-1} (1 vvm) y un inóculo de 4 L aforando a un volumen total de 11 L con medio mineral sin fuente de nitrógeno BG11₀ (Ripkka *et al.*, 1979).

Se llevaron a cabo observaciones al microscopio óptico durante el cultivo en lote del CM en el fotobiorreactor tipo columna de burbujas, para estudiar la posible variación de los organismos que lo conforman; Al final del cultivo, se tomó una muestra homogénea de 50 ml para llevar a cabo el análisis morfológico y la determinación de la abundancia relativa de cada componente del CM.

Para la identificación morfológica de cianobacterias y organismos eucariotes que componen el CM, se utilizaron muestras frescas y para las diatomeas se utilizaron preparaciones fijas empleando la resina Naphrax® (Rushforth *et al.*, 1984). Todas las muestras se examinaron y fotografiaron con un microscopio óptico BX51 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) y una cámara digital marca Nikon DXM1200. La identificación de las especies de diatomeas se realizó de acuerdo a Krammer y Lange-Bertalot (1986, 1988, 1991a, y 1991b) y de las clorofíceas de acuerdo a Wehr y Sheath (2003).

La abundancia relativa de cada componente microbiano en el CM se determinó a partir de su identificación morfológica y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (Franco *et al.*, 2001):

$$p_i = \frac{N_i}{\sum_{i=1}^s N_i} \quad (1)$$

donde:

p_i =abundancia relativa de las especies i

S = número total de especies en la comunidad

N_i = número de individuos de la misma especie i

En el análisis morfológico se tomaron en cuenta todas las fotografías tomadas a las microalgas verdes y cianobacterias presentes en el CM, además del número de repeticiones (N_i) de cada uno de los cuatro géneros registrados. Se siguió el mismo procedimiento para las diatomeas, cuyo total de fotografías fue $S=81$ y el número de repeticiones (N_i) de cada uno de los siete géneros encontrados.

Una vez identificados los microorganismos que conforman el CM y conociendo la capacidad de fijación de nitrógeno del mismo, fue necesario estudiar otras posibles actividades metabólicas del CM como la capacidad de solubilizar fósforo o de producir promotores de crecimiento como el ácido indol acético (IAA), que podrían mejorar el uso potencial del CM como biofertilizante.

7.2 ETAPA 2. Actividad metabólica del CM

Para estudiar la capacidad del CM para solubilizar fósforo, se determinó la actividad de fosfatasa (fosfomonoesterasa (PMEasa) y fosfodiesterasa (PDEasa)) (enzimas encargadas de realizar este proceso) en la muestra obtenida al final del cultivo por lote, utilizando el método descrito por Whitton *et al.* (1999) para

musgos y algas verdes en ríos, este a su vez se basa en la metodología empleada por Grainger *et al.* (1989). (ANEXO II).

Para corroborar la capacidad del CM para solubilizar fósforo, así como la diversidad de organismos procariotes que lo conforman, a partir de la biomasa obtenida al final del cultivo por lote se llevó a cabo un estudio microbiológico utilizando medios definidos tales como Pikovskaya (PVK), Rennie (MR) y Agar nutritivo (AN). Se hicieron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-7} y se plaqueó 0.1 mL por extensión con varilla codada; todas las siembras se realizaron por triplicado en los medios mencionados previamente; las diluciones utilizadas para cada medio así como los tiempos y temperatura de incubación se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Análisis microbiológico del CM en diferentes medios de cultivo

Medio	Dilución	Tiempo de incubación (d)	Temperatura (°C)
PVK	$10^{-3} - 10^{-6}$	7	28
MR	$10^{-3} - 10^{-6}$	3	28
AN	$10^{-4} - 10^{-7}$	3	28

El medio Pikovskaya se utiliza para la detección de microorganismos solubilizadores de fosfato (Pikovskaya, 1948).

El medio Rennie se emplea para identificar organismos libres fijadores de nitrógeno (Rennie, 1981).

El agar nutritivo se utilizó para el crecimiento en placa de las bacterias presentes en el CM y a partir de ellas, se seleccionaron 21 colonias al azar correspondientes a la dilución 10^{-6} que se transfirieron a tubos de 5 mL con 1 mL de medio Luria-Bertani (Bric *et al.*, 1991). Se incubaron por 2 días a 28 °C, para posteriormente

realizar la determinación de compuestos indólicos como el ácido indol acético utilizando la técnica descrita por Glickmann y Dessaux (1995).

7.3 ETAPA 3. Producción en lote del CM en un FBR de 50 L

La producción del CM se llevó a cabo en un FBR tipo *air-lift* de cara plana de 52 L de volumen total y 50 L como volumen útil bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Se utilizaron 12 L de cultivo como inóculo proveniente de los fotobiorreactores tipo columna de burbujas de 11 L y se aforó con 44 L de medio mineral BG-11₀ (Rippka *et al.*, 1979). La incubación se llevó a cabo a una temperatura de 21 ± 2 °C, con un flujo de aire de 30 L min^{-1} y una cantidad de luz de $80 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, proporcionada mediante lámparas de luz blanca orientadas hacia una sola cara del FBR (zona ascendente) (Reyna-Velarde, 2010). La intensidad lumínica se evaluó mediante un radiómetro Quantitherm (Light Meter Thermometer) Hansatech Instruments LTD (QRT1) PE32 1JL.UK. El vaciado del inóculo y la preparación del medio de cultivo se llevó a cabo en condiciones de esterilidad; además se mantuvieron condiciones asépticas dentro del FBR de 50 L para el cultivo del CM, para ello el FBR se lavó con extran, agua destilada e hipoclorito de sodio para su asepsia y posterior a la inoculación se selló por la parte superior con una placa de acrílico previamente sanitizada.

Se tomaron muestras cada 48 horas por 14 días para evaluar el desempeño biológico del cultivo e identificar diferentes parámetros que pudieran afectar el funcionamiento del CM (Tabla 7).

Tabla 7. Metodologías analíticas para la evaluación del desempeño biológico del consorcio microbiano

Determinación	Técnica	Referencia
Crecimiento	Peso seco	Tredici <i>et al.</i> , 1991
Clorofila a	Pruebas espectrofotométricas a 665, 666 y 750 nm	Brock <i>et al.</i> , 2004
Actividad nitrogenasa	de Ensayo de reducción de acetileno	Venkataraman, 1981
Cuantificación fósforo inorgánico	de Método modificado de Taussky y Shorr	González y Peñalosa <i>et al.</i> , 2000
Cuantificación nitratos (NO₃⁻)	de Método de Brucina-Ácido Sulfámico	APHA, AWWA, WPCF, 1992
Producción de NH₄⁺	Método del fenato No.132 C	APHA, AWWA, WPCF, 1971
pH	Potenciómetro	

El procedimiento detallado para la realización de cada una de las técnicas se describe en el ANEXO I. A continuación se describe brevemente la importancia de los parámetros evaluados:

7.3.1 Peso seco

Este método nos permite conocer la concentración de biomasa en un volumen determinado de cultivo (Tredici *et al.*, 1991). Considerando que el CM bajo estudio tiene la capacidad de formar una matriz de exopolisacárido, la cuantificación de biomasa en peso seco equivale a todos los microorganismos que conforman el CM más el exopolisacárido producido.

7.3.2 Actividad de nitrogenasa

La cuantificación de la actividad de nitrogenasa, es una medida indirecta de la capacidad de fijación de nitrógeno del consorcio (Venkataraman, 1981). El método se basa en el hecho de que la enzima nitrogenasa también puede reducir acetileno a eteno (etileno), el cual es posible cuantificar mediante cromatografía de gases y relacionar su valor con la capacidad de fijación de nitrógeno de la

biomasa estudiada; cada 3 moles de eteno producidos corresponden a un mol de nitrógeno fijado biológicamente (Brock *et al.*, 2004).

7.3.3 Clorofila a

La determinación de clorofila a se utiliza para cuantificar de manera indirecta la cantidad de organismos fotosintéticos presentes en una muestra (Whitton, 2000). Al tener diferentes pigmentos, dos microorganismos no relacionados pueden coexistir en un mismo hábitat, por lo tanto, la diversidad en la pigmentación tiene significado ecológico (Brock *et al.*, 2004).

7.3.4 Amonio

La cuantificación de nitrógeno como amonio (NH_4^+) producido por el consorcio, es una medida indirecta de la cantidad de nitrógeno transformado; esta técnica está basada en la reacción del amonio, fenol e hipoclorito, que da como resultado la formación de una molécula de indofenol, provocando una coloración azul con una absorbancia máxima a 640 nm (APHA, AWWA, WPCF, 1971).

Existen algunos agentes externos que pueden inhibir el complejo enzimático nitrogenasa como son: O_2 , N_2 , NH_4^+ , NO_3^- y ciertos aminoácidos que actúan a nivel transcripcional (Brock *et al.*, 2004; Masukawa *et al.* 2014). Almon y Boger (1988) y Li *et al.* (2010) reportaron que una concentración de 1 mM de NH_4^+ y 20 mM de NO_3^- inhibe completamente la actividad de la enzima nitrogenasa, por lo tanto es necesario determinar durante el crecimiento la cantidad de estos compuestos a través del tiempo.

7.3.5 Fósforo

La cuantificación de PO_4^{-3} es muy importante debido a que es uno de los nutrientes minerales esenciales para el crecimiento de organismos autótrofos ya

que participa en la generación de la energía (ATP) necesaria para realizar diferentes procesos metabólicos en la célula (Ashwani y Sharma, 2006).

7.3.6 pH

El seguimiento del pH a través del tiempo es importante debido a que el valor del pH óptimo para que el metabolismo de los microorganismos que conforman el CM funcione adecuadamente es diferente; además de que su variación puede afectar diversos parámetros como la actividad enzimática, el crecimiento celular, la producción de exopolisacáridos, etc. (Morales *et al.*, 2002; Otero y Vincenzini, 2004).

La velocidad específica de crecimiento (μ) se calculó de acuerdo a la ecuación 2:

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

Donde N_1 y N_2 (mg L^{-1}) representan la concentración de biomasa en base seca al tiempo t_1 y t_2 (d^{-1}) (Issarapayup *et al.*, 2009).

7.4 ETAPA 4. Escalamiento ascendente y descendente del FBR de 50 L a un volumen de 150 L y de 16 L

Para el escalamiento del FBR se conservó la geometría descrita por Reyna-Velarde *et al.* (2010) aplicando como criterio de escalamiento ascendente y descendente la relación A/V (área iluminada/volumen de operación) de 7.3 m^{-1} .

7.4.1 Escalamiento ascendente del FBR

Aplicando el criterio de escalamiento ascendente basado en la relación A/V, se construyó un fotobiorreactor tipo *air-lift* de cara plana empleando placas de acrílico translúcidas sin color de 0.005 m de espesor (Acrisermex S.A de C.V.); las especificaciones del diseño son las siguientes: volumen de trabajo 150 L, largo de 1.56 m, altura de 0.78 m, ancho (*light-path*) de 0.14 m, con una relación del área

de la sección transversal de la zona “downcomer” con respecto a la zona “riser” (Ad/Ar) igual a 1 (Fig. 3). La altura de la placa central fue 0.61 m y se colocó 0.04 m separada de la base del FBR. El aire se alimentó al FBR por medio de un tubo de acero inoxidable de 0.006 m de diámetro externo, al que se hicieron 26 orificios de 0.002 m de diámetro cada uno, colocado a lo largo de la base del FBR, lo más cerca posible a la cara frontal del mismo. El flujo de aire se controló con un rotámetro con flotador de acero inoxidable (Stainless steel-float, Key instruments, USA).

7.4.2 Escalamiento descendente

Aplicando el criterio de escalamiento descendente basado en la relación A/V se construyó un fotobiorreactor tipo *air-lift* de cara plana empleando placas de acrílico translúcidas sin color de 0.005 m de espesor (Acrisermex S.A de C.V.); las especificaciones del diseño son las siguientes: volumen de trabajo 16 L, largo de 0.41 m, altura de 0.34 m, ancho (*light-path*) de 0.14 m, con una relación del área de la sección transversal de la zona “downcomer” con respecto a la zona “riser” (Ad/Ar) igual a 1 (Fig. 4). La altura de la placa central fue 0.24 m y se colocó 0.03 m separada de la base del FBR. El aire se alimentó al FBR por medio de un tubo de acero inoxidable de 0.006 m de diámetro externo, al que se hicieron 8 orificios de 0.002 m de diámetro cada uno, colocado a lo largo de la base del FBR, lo más cerca posible a la cara frontal del mismo. El flujo de aire se controló con un rotámetro con flotador de carboloy (aleación a base de tungsteno con cobalto o níquel) (Carboloy-float, Cole-Parmer, USA).

Una vez construidos los FBR de 150 y 16 L, se llevó a cabo su caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa.

También se llevó a cabo la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa del FBR reportado por Reyna-Velarde *et al.* (2010) utilizando como modelo de estudio el CM en el sistema trifásico.

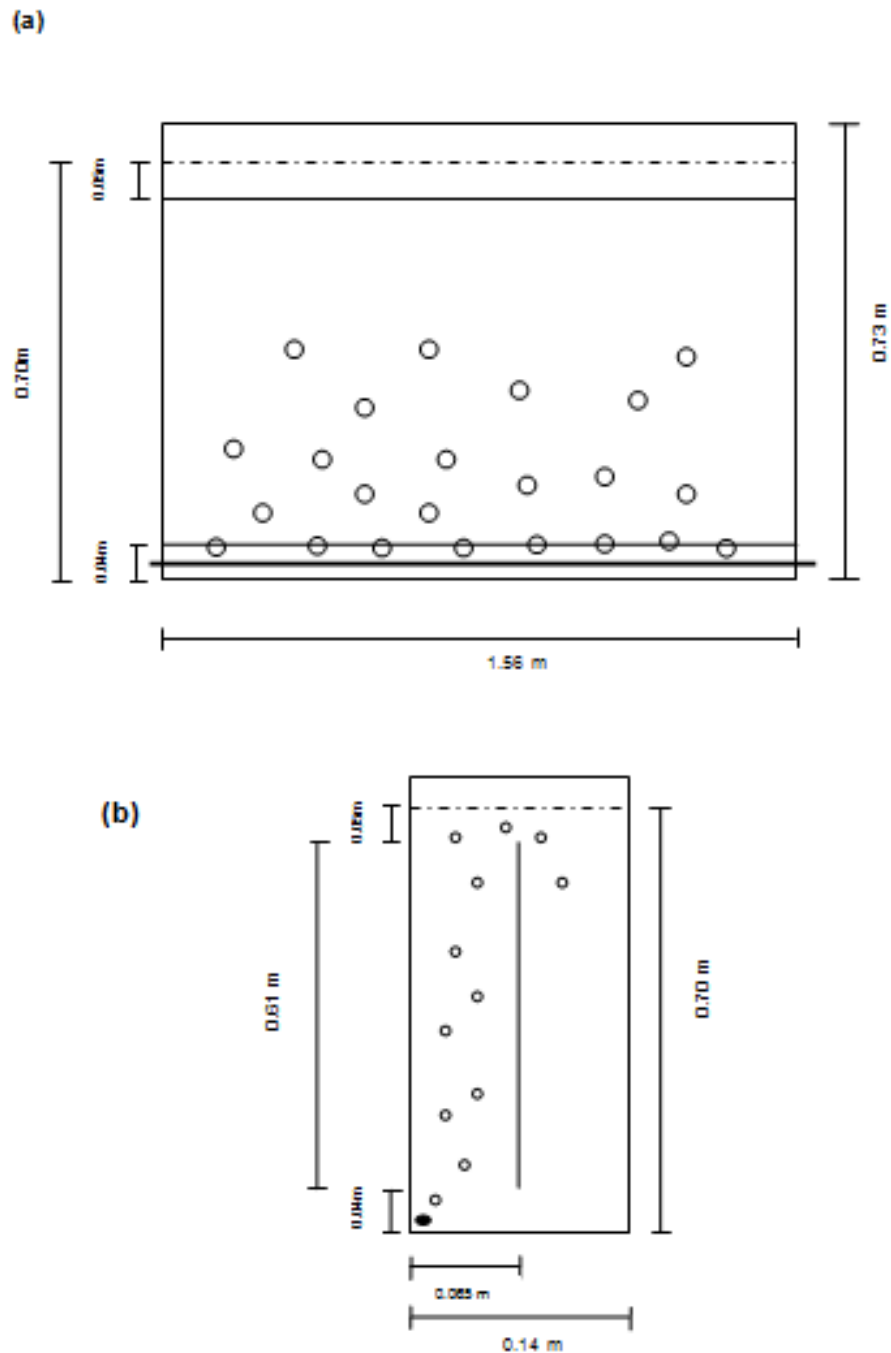
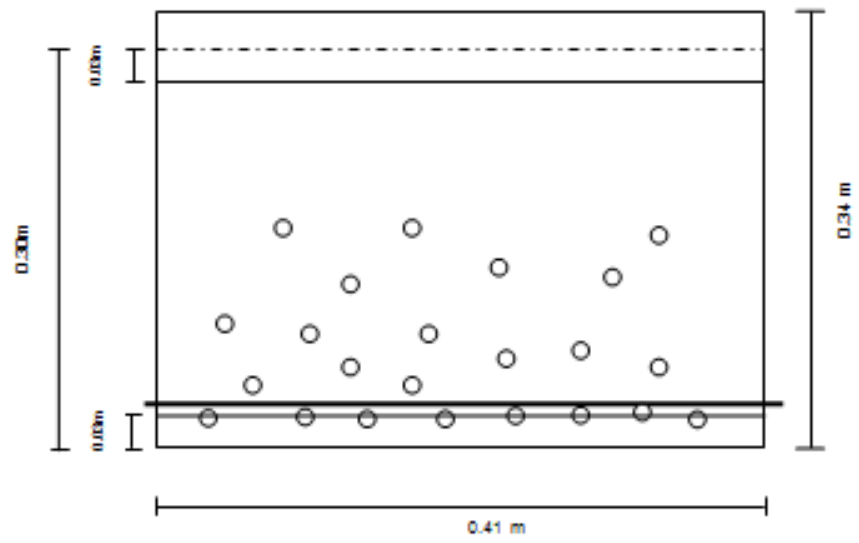


Figura 3. Diagrama del FBR de 150 L: (a) vista frontal, (b) vista lateral (Escalamiento ascendente)

I
(a)



(b)

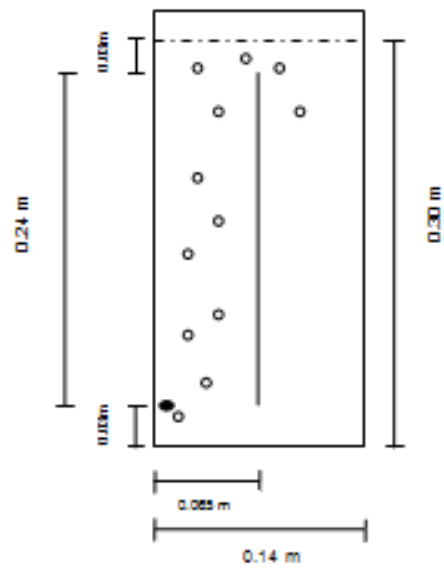


Figura 4. Diagrama del FBR de 16 L: (a) vista frontal, (b) vista lateral (Escalamiento descendente)

7.4.3 Microorganismo y condiciones de cultivo

Para el sistema trifásico se utilizó como modelo de estudio el CM aislado y caracterizado previamente en el grupo de trabajo (Reyna-Velarde *et al.*, 2012). Se llevaron a cabo cinéticas de producción en cultivo por lote del CM en los tres FBR (16, 50 y 150 L) utilizando para su propagación el medio mineral sin fuente de nitrógeno BG-11₀ (Rippka *et al.*, 1979). Las condiciones de operación de cada uno de estos fotobiorreactores se describen a continuación:

En el FBR de 16 L se utilizaron 5 L de inóculo de 336 h (14 d) de edad y se aforó con 11 L de medio de cultivo. El flujo de aire suministrado al fotobiorreactor fue de 10 L min⁻¹ (equivalente a una velocidad superficial de gas de 0.0029 m s⁻¹). El cultivo se mantuvo a una temperatura de 21 ± 2°C con iluminación en la placa frontal por medio de un arreglo paralelo horizontal de 4 lámparas de luz blanca (Silvania, USA) a una densidad de flujo fotónico de 80 μmol fotones m⁻² s⁻¹.

En el FBR de 50 L se utilizaron 16 L de inóculo de 120 h (5 d) de edad y se aforó con 34 L de medio de cultivo. El flujo de aire suministrado al fotobiorreactor fue de 25 L min⁻¹ (equivalente a una velocidad superficial de gas de 0.0042 m s⁻¹). El cultivo se mantuvo a una temperatura de 21 ± 2°C con iluminación en la placa frontal por medio de un arreglo paralelo horizontal de 6 lámparas de luz blanca (Silvania, USA) a una densidad de flujo fotónico de 80 μmol fotones m⁻² s⁻¹.

En el FBR de 150 L se utilizaron 50 L de inóculo de 336 h (14 d) de edad y se aforó con 100 L de medio de cultivo. El flujo de aire suministrado al fotobiorreactor fue de 90 L min⁻¹ (equivalente a una velocidad superficial de gas de 0.0068 m s⁻¹). El cultivo se mantuvo a una temperatura de 21 ± 2°C con iluminación en la placa frontal por medio de un arreglo paralelo horizontal de 16 lámparas de luz blanca (Silvania, USA) a una densidad de flujo fotónico de 80 μmol fotones m⁻² s⁻¹.

El cultivo por lote alcanzó la fase estacionaria a los 5, 14 y 14 d en los FBR de 16, 50 y 150 L respectivamente; a estos tiempos se llevó a cabo la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa de cada FBR. La concentración de biomasa en base seca en los tres FBR se determinó mediante la técnica descrita por Tredici *et al.* (1991) durante el cultivo por lote. La densidad del líquido (ρ) en el sistema bifásico y trifásico se determinó mediante la técnica descrita por Mott (2006).

7.4.4 Caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa

Las características hidrodinámicas y de transferencia de masa de los fotobiorreactores utilizando un sistema bifásico (aire-agua) y un sistema trifásico (microorganismo-medio de cultivo- aire), fueron medidas a 21 ± 2 °C, a la presión atmosférica de la Ciudad de México (585 mmHg).

7.4.4.1 Tiempo de mezclado

El tiempo de mezclado (t_m) es el tiempo necesario para alcanzar un 95 % de mezcla completa (Sierra *et al.*, 2008). Este parámetro se determinó mediante el método del trazador ácido (Camacho *et al.*, 2004)

7.4.4.2 Gas hold-up

El gas hold-up (ε) se evaluó de acuerdo al método de expansión volumétrica propuesto por Chisti (1989) (Ecuación 3):

$$\varepsilon = \frac{H_G - H_L}{H_G} \quad (3)$$

Donde H_L y H_G son la altura del líquido y gas+ líquido en el FBR respectivamente

7.4.4.3 Coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$)

El $k_L a$ se evaluó mediante el método dinámico propuesto por Kargi y Moo-Young (1985) en el cual este parámetro corresponde a la pendiente de la ecuación 4:

$$\ln\left(\frac{C^*-C_0}{C^*-C}\right) = k_L a(t - t_0) \quad (4)$$

Donde C^* es la concentración de saturación de oxígeno disuelto (OD), C_0 es la concentración de OD al tiempo t_0 , y C es la concentración de OD al tiempo t . El OD se evaluó empleando un medidor de OD Oakton DO100 (Oakton USA) situado en el centro de cada zona (ascendente y descendente). Considerando que las áreas de la sección transversal son iguales, el $k_L a$ global se calculó promediando el $k_L a$ de las zonas ascendente y descendente (Ecuación 5) (Chisti 1989; Sánchez *et al.*, 2000):

$$k_L a = \frac{A_r k_L a_r + A_d k_L a_d}{A_r + A_d} \quad (5)$$

Donde A_r es el área de la sección transversal de la zona “riser”, $k_L a_r$ es el $k_L a$ en la zona “riser”, A_d es el área de la sección transversal de la zona “downcomer”, $k_L a_d$ es el $k_L a$ en la zona “downcomer”.

7.4.4.4 Potencia volumétrica (P/V)

La potencia volumétrica se calculó como una función de la densidad del líquido, la velocidad superficial de gas y la relación entre las áreas de la sección transversal de la zona ascendente (A_r) y descendente (A_d). Este parámetro se determinó mediante la ecuación propuesta por Chisti (1989):

$$\frac{P}{V} = \frac{\rho_L g U_G}{1 + A_d/A_r} \quad (6)$$

Donde P/V es la potencia volumétrica [$W m^{-3}$], ρ_L es la densidad de líquido [$kg m^{-3}$], g es la aceleración gravitacional [$m s^{-2}$], U_G es la velocidad superficial de gas [$m s^{-1}$] basada en el área total de la sección transversal del FBR, A_d es el área de la sección transversal de la zona “downcomer” [m^2], A_r es el área de la sección

transversal de la zona “riser” [m²], siendo estas últimas iguales en los FBR ($A_d=A_r$), por lo que el denominador de la ecuación 6 es igual a 2.

7.5 ETAPA 5. Optimización de las condiciones de cultivo del CM en un FBR de 150 L bajo condiciones controladas

Para llevar a cabo la optimización de las condiciones de cultivo del CM se utilizó el FBR tipo *air-lift* de cara plana de 150 L previamente caracterizado en su hidrodinamia y su transferencia de masa. Se ensayaron tres tasas de dilución (12, 24 y 33%) variando el volumen de inóculo con una concentración aproximada de 100 mg L⁻¹ de biomasa en base seca, proveniente del FBR de 50 L. Se realizaron tres cultivos por lote bajo condiciones controladas de luz y temperatura, con un tiempo de residencia hidráulico de 14 días. En los experimentos se utilizó el medio mineral BG-11₀, una temperatura de 18 ± 2 °C, un flujo de aire de 90 L min⁻¹ y una intensidad lumínica de 100 μmol fotones m⁻² s⁻¹. Se tomaron muestras diarias a lo largo de cada cultivo por lote, y se determinó el desempeño biológico del CM evaluándose los parámetros mencionados en la Tabla 7.

Una vez seleccionado el porcentaje de inóculo, se llevó a cabo una comparación del desempeño biológico del CM en cada cultivo por lote variando el flujo de aire suministrado al FBR de 150 L, evaluando los parámetros mencionados en la Tabla 7. Lo anterior se hizo con la finalidad de encontrar el mejor rendimiento de biomasa y una alta fijación de nitrógeno. Los flujos de aire seleccionados con base en la caracterización hidrodinámica del FBR de 150 L fueron: 60, 70, 80, 90 y 100 L min⁻¹. No fue posible utilizar un flujo de aire inferior a 60 L min⁻¹ debido a que la potencia suministrada al fotobiorreactor no fue suficiente para alimentar toda la línea de aire, lo que provocaba que la parte central quedara sin movimiento. Al trabajar con un flujo de aire superior a 100 L min⁻¹ se produjo un

flujo turbulento dentro del fotobiorreactor, además de una pérdida importante de volumen de líquido por evaporación.

Las condiciones de operación de cada uno de los lotes de cultivo fueron: volumen de trabajo de 150 L, medio mineral estéril sin fuente de nitrógeno (BG-11₀), intensidad lumínica 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura $18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y un tiempo de residencia hidráulico de 14 días.

También se optimizaron las condiciones de cultivo del CM en el FBR de menor tamaño (16 L) variando el flujo de aire suministrado al reactor. Se evaluó el desempeño biológico del CM en cada cultivo por lote, a dos flujos de aire 10 y 12 L min^{-1} y el mismo porcentaje de inóculo del FBR de 150 L. Se realizaron dos cultivos por lote con duración de 14 días cada uno, empleando como inóculo la biomasa proveniente del fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 11 L. Se aforó con medio mineral BG-11₀, trabajándose a una temperatura de $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, y una intensidad lumínica de 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Se tomaron muestras diariamente en cada cultivo por lote y se determinaron los parámetros mencionados en la Tabla 7.

Una vez que se seleccionaron las condiciones más adecuadas para el crecimiento del CM en los FBR de 16 y 150 L, se llevó a cabo el escalamiento de la producción de biomasa de manera secuencial, realizándose cinéticas de producción por lote como se describe a continuación:

En el FBR de 16 L se utilizaron 5 L de inóculo proveniente del fotobiorreactor tipo columna de burbujas y se agregaron 11 L de medio de cultivo estéril sin nitrógeno. Se suministró un flujo de aire de 10 L min^{-1} , la temperatura se mantuvo a $21 \pm 2^\circ\text{C}$ con iluminación en la placa frontal por medio de un arreglo paralelo horizontal de

4 lámparas de luz blanca (Silvania, USA) con una densidad de flujo fotónico de 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En el FBR de 50 L se emplearon 16 L de inóculo proveniente del FBR de 16 L y 34 L de medio de cultivo estéril para completar el volumen. El flujo de aire suministrado al fotobiorreactor fue de 30 L min^{-1} ; el cultivo se mantuvo a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y se iluminó en la placa frontal por un arreglo paralelo horizontal de 6 lámparas de luz blanca (Silvania, USA) con una densidad de flujo fotónico de 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

En el FBR de 150 L se utilizaron 50 L de inóculo proveniente del FBR de 50 L y se adicionaron 100 L de medio de cultivo estéril. El flujo de aire suministrado al fotobiorreactor fue de 80 L min^{-1} ; el cultivo se mantuvo a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y se iluminó en la placa frontal con un arreglo paralelo horizontal de 16 lámparas de luz blanca (Silvania, USA) con una densidad de flujo fotónico de 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

El tiempo de residencia hidráulico de cada uno de los fotobiorreactores mencionados fue de 5, 14 y 14 d respectivamente. Se tomaron muestras diariamente a lo largo de cada cultivo por lote y se determinaron los parámetros mencionados en la Tabla 7.

7.6 ETAPA 6. Diseño del bioproceso para la producción del biofertilizante a escala semi piloto

Se llevó a cabo tomando en cuenta los parámetros de crecimiento del CM previamente determinados y se consideraron: un compresor de aire, tuberías, 4 bombas, un tanque para medio de cultivo, un tanque para cosecha, FBR de 16 L y 50 L para el inóculo y el FBR de 150 L para la producción final del CM.

7.7 ETAPA 7. Producción del CM por lote y lote secuencial en un FBR de 150 L a la intemperie

7.7.1 Producción en cultivo por lote

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas para la producción del CM bajo condiciones controladas de luz y temperatura en los tres FBR (16, 50 y 150 L), se llevó a cabo un primer ensayo para evaluar la producción del CM y su desempeño biológico en el FBR de 16 L a la intemperie en cultivo por lote. Las condiciones de cultivo fueron: volumen de operación de 16 L, se fijó un porcentaje de inóculo del 33 % (5 L) el cual provenía del fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 11 L en condiciones controladas, 11 L de medio mineral BG-11₀ sin esterilizar, y un flujo de aire de 10 L min⁻¹. La temperatura exterior e interior del FBR, así como la intensidad lumínica, se midieron tres veces cada día utilizando un termómetro de mercurio y un radiómetro Quantitherm (Light Meter Thermometer) Hansatech Instruments LTD (QRT1) PE32 1JLUK respectivamente. Se colocó una base de madera y malla sombra de metal de un calibre de aproximadamente 2 mm en la parte inferior y superior del FBR respectivamente con la finalidad de regular su temperatura interior. Se tomaron muestras diariamente por 14 días y se determinaron los parámetros mencionados en la Tabla 7.

Una vez evaluado el desempeño biológico del CM en el FBR de 16 L, se procedió a producir el CM en cultivo por lote en los tres FBR, de 16, 50 y 150 L y a determinar su desempeño biológico de acuerdo a los parámetros mencionados en la Tabla 7. Los tres FBR a la intemperie se colocaron sobre una base de madera y con malla sombra en la parte superior.

El escalamiento de la producción de biomasa se llevó a cabo de manera secuencial en los tres FBR utilizando el mismo porcentaje de inóculo y los flujos

de aire seleccionados. Se realizaron cinéticas de producción por lote como se describe a continuación:

En el FBR de 16 L se utilizaron 5 L de inóculo provenientes del fotobiorreactor tipo columna de burbujas y 11 L de medio de cultivo BG11₀. El flujo de aire suministrado al fotobiorreactor fue de 10 L min⁻¹.

En el FBR de 50 L se utilizaron 16 L de inóculo provenientes del FBR de 16 L y 34 L de medio de cultivo BG-11₀. El flujo de aire suministrado al fotobiorreactor fue de 30 L min⁻¹.

En el FBR de 150 L se utilizaron 50 L de inóculo proveniente del FBR de 50 L y 100 L de medio de cultivo BG-11₀. El flujo de aire suministrado al fotobiorreactor fue de 80 L min⁻¹.

El tiempo de residencia hidráulico de cada uno de los fotobiorreactores mencionados fue de 10, 14 y 14 d respectivamente. La temperatura exterior e interior de los FBR, así como la intensidad lumínica se midieron diariamente (tres veces al día) con los instrumentos mencionados previamente.

Para disminuir los costos de operación, los FBR y el medio de cultivo no se esterilizaron, además de que se operaron a la intemperie lo que implica un ahorro de energía lumínica. Los FBR se lavaron con extran, agua destilada e hipoclorito de sodio para su asepsia. El medio de cultivo se preparó con agua destilada. Una vez inoculados los FBR se sellaron de la parte superior con una tapa de acrílico transparente y silicón, dejando únicamente una salida de aire para evitar su presurización.

7.7.2 Producción por lote secuencial

Una vez realizadas las cinéticas de producción por lote en los tres FBR y habiendo evaluado el desempeño biológico del CM en cada uno de ellos, se

procedió a la producción por lote secuencial del CM por tres ciclos en los FBR de 16 y 150 L con la finalidad de aumentar la productividad de biomasa a través del tiempo.

La producción de biomasa se realizó bajo las condiciones de operación (cantidad de inóculo, medio de cultivo y flujo de aire) que se mencionaron previamente en cultivo por lote a la intemperie en cada uno de los FBR. Cada vez que se alcanzó el valor máximo de biomasa establecido, se realizaron recambios del 50 % biomasa por medio fresco. Se tomaron muestras diariamente por 21 y 19 días en el FBR de 16 y 150 L respectivamente, y se determinaron los parámetros mencionados en la Tabla 7. De igual manera que en cultivo por lote a la intemperie, los FBR se colocaron sobre una base de madera y malla sombra en la parte superior. La temperatura exterior e interior de los FBR, así como la intensidad lumínica se midieron tres veces al día con los instrumentos antes mencionados.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 ETAPA 1. Mantenimiento e identificación morfológica del CM en un FBR tipo columna de burbujas de 11 L

En la figura 5 se presenta la cantidad máxima de biomasa en base seca al final del experimento (día 14), misma que fue de 0.305 g L^{-1} con una productividad de $0.015437 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. También es posible observar, que el CM presentó una fase de adaptación de 7 días con una disminución de la cantidad de biomasa cercana al 5 %. El crecimiento exponencial de la biomasa se presentó del día 8 al 14; en la misma figura se aprecia que la actividad de nitrogenasa tuvo un comportamiento oscilante, disminuyendo al día 7 e incrementando posteriormente hasta $10,294 \text{ nmoles etileno g}^{-1} \text{ peso seco h}^{-1}$ al final del experimento. El CM en cultivo por lote

en el FBR de 11 L mostró una capacidad de fijación de nitrógeno cinco veces mayor a la reportado por Kannaiyan *et al.* (1997) para las especies: *Anabaena variabilis* Sao (2678 nmoles etileno g⁻¹ peso seco h⁻¹) y *Nostoc muscorum* DOH (2 237 nmoles etileno g⁻¹ peso seco h⁻¹) presentes en su cultivo; la importancia de estas cianobacterias en cultivos agrícolas (*Anabaena* y *Nostoc*) radica en su capacidad para establecer simbiosis con plantas, así como en su capacidad de fijar nitrógeno en el suelo, por lo que su biomasa ha sido ampliamente utilizada como biofertilizante en países tropicales (Kannaiyan, 2002b).

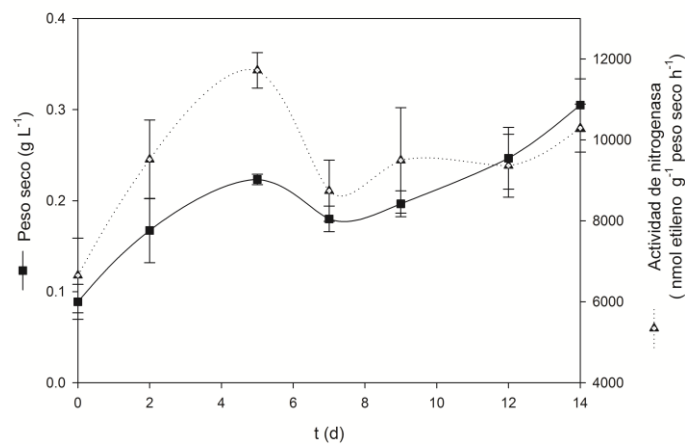


Figura 5. Evolución temporal de la biomasa (g L⁻¹) y la actividad de nitrogenasa de un consorcio microbiano

El análisis microscópico de los morfotipos del CM registró un total de 11 taxones (Tabla 8) donde, dos géneros fueron de cianobacterias filamentosas, *Anabaena oscillarioides* (figura 6A y B) y *Leptolyngbya* sp. (figura 6C), además de nueve taxa unicelulares integrados por las clorofitas *Monoraphidium* sp. (figura 6D y E), *Chlorella* sp. (figura 6F) y las diatomeas *Cyclotella meneghiniana* (figura 6I), *Melosira varians* (figura 6H), *Cocconeis placentula* (figura 6J), *Achnanthydium chlidanos* (figura 6M), *Navicula radiosa* (figura 6K), *Fragilaria ulna* (figura 6L) y *Nitzschia* sp. (figura 6G). En la figura 7 se muestra la abundancia relativa de los

organismos que comprenden el CM analizando con los datos microscópicos, donde se observan 4 especies mayoritarias, la cianobacteria filamentosa *A. oscillarioides*, la microalga verde *Monoraphidium* sp. y las diatomeas *Cocconeis placentula*, *Fragilaria ulna* y *Nitzchia* sp. (la más abundante).

Tabla 8. Morfotipos presentes en el consorcio microbiano

Grupo	Morfotipo	Ubicación
Cianobacterias	<i>Anabaena oscillarioides</i> Bory de Saint-Vincent ex Bornet & Flahault	Figura 6A y B
	<i>Leptolyngbya</i> sp.	Figura 6C
Microalgas verdes	<i>Monoraphidium</i> sp.	Figura 6D y E
	<i>Chlorella</i> sp.	Figura 6F
Diatomeas	<i>Nitzchia</i> sp.	Figura 6G
	<i>Melosira varians</i> C. Agardh	Figura 6H
	<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing	Figura 6I
	<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg	Figura 6J
	<i>Navicula radiosa</i> Kützing	Figura 6K
	<i>Fragilaria ulna</i> (Nitzsch) Lange-Bertalot	Figura 6L
	<i>Achnanthisidium chlidanos</i> (Hohn&Hellerman) Novelo, Tavera& Ibarra	Figura 6M

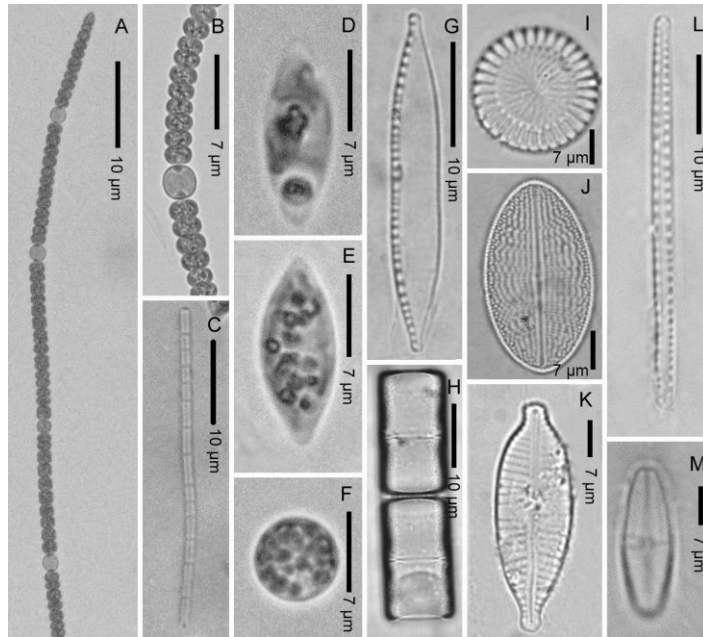


Figura 6. Microfotografías de los morfotipos de cianobacterias, microalgas verdes y diatomeas en el CM. A, *Anabaena oscillarioides*, filamento y heterocistos intercalados. B, *Anabaena* sp., heterocisto y células vegetativas con abundante granulación. C, *Leptolyngbya* sp. D, *Monoraphidium* sp., célula vegetativa. E, *Monoraphidium* sp., vacuolas o lípidos celulares. F, *Chlorella* sp. G, *Nitzschia* sp. H, *Melosira varians*. I, *Cyclotella meneghiniana*. J, *Cocconeis placentula*. K, *Navicula radiosa*. L, *Fragilaria ulna*. M, *Achnanthydium chlidanos*.

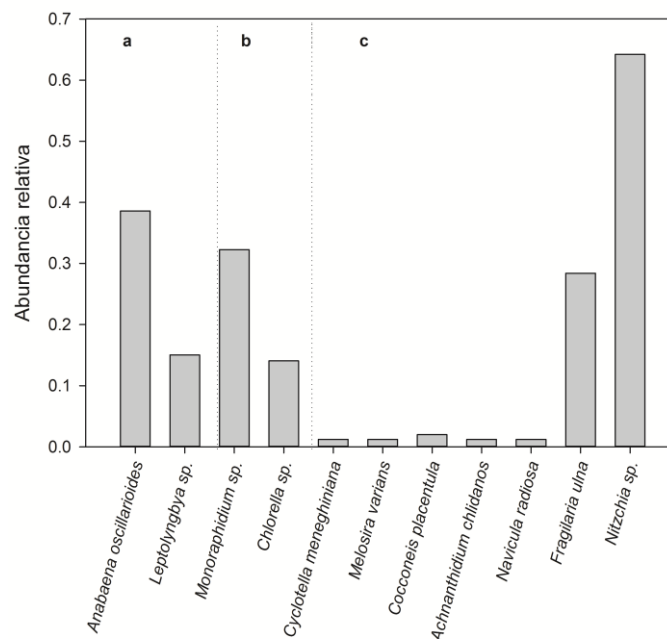


Figura 7. Abundancia relativa de cada taxón encontrado en el CM tras el análisis morfológico. a-cianobacterias, b-microalgas verdes, c-diatomeas

Los análisis morfológico (presente estudio) y filogenético (reportado previamente por nuestro grupo de investigación (Hernández, 2009)) mostraron elevada abundancia relativa de las cianobacterias *Anabaena oscillarioides*, *Aphanizomenon aphanizomenoides* y *Leptolyngbya* sp., y de las bacterias *Rhodobacter* sp. y *Devosia insulae*, las cuales han sido reportadas por Rivas *et al.* (2002) y Li *et al.* (2010) como fijadoras de nitrógeno, por lo que es posible atribuir la elevada eficiencia de fijación de nitrógeno del CM a la presencia de estas especies.

A partir del análisis morfológico fue posible identificar a los géneros *Monoraphidium* sp. y *Chlorella* sp. como parte del CM. De acuerdo a reportes en literatura estas especies tienen la capacidad de proveer diversos elementos constitutivos a las plantas como el fósforo cuando se adicionan al suelo como biofertilizantes (Megharaj *et al.*, 1992) y cuando se utilizan como inoculantes, aumentan la fertilidad de suelos áridos (Trejo *et al.*, 2012). Por lo anterior y considerando la alta abundancia relativa de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno que constituyen al CM es de esperarse el desempeño exitoso de éste como biofertilizante. Además, de que los géneros de diatomeas identificados pueden contribuir a los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, silicio y hierro, por lo tanto tienen un efecto positivo en el ambiente y en otros componentes del CM (Amin *et al.*, 2012). Adicionalmente, las diatomeas tienen la capacidad de producir partículas transparentes de exopolisacárido que ayudan a formar una matriz de diatomeas agregadas y bacterias heterotróficas que mejoran la eficiencia de los consorcios microbianos (Gärdes *et al.*, 2011). *Pedomicrobium americanum* y *Nannocystis* sp. contribuyen a la agregación de los integrantes del CM, mediante la formación de una matriz extracelular de polisacáridos, que le

protege contra organismos autóctonos del suelo donde se llegase a adicionar como biofertilizante.

La diversidad tan amplia de microorganismos que conforman el CM, facilita la interacción de diferentes especies de organismos eucariotes y procariotes, relacionados con ese microcosmos particular.

Bauer *et al.* (2008) realizaron estudios similares al presente trabajo y destacaron la importancia de la identificación e interacción de los organismos que integran los consorcios microbianos. Uno de sus hallazgos más importantes, fue la presencia de cianobacterias y bacterias heterotróficas, las cuales establecen relaciones simbióticas entre sí. De manera similar, las diatomeas frecuentemente se asocian con bacterias epífitas en lagos de agua dulce (Paerl, 1990). La importancia de la amplia diversidad de microorganismos que integran un consorcio microbiano en un sistema natural o artificial como es el caso de los fotobiorreactores, radica en el hecho de que existe un intercambio de metabolitos y factores de crecimiento conforme transcurre el tiempo (Paerl y Pinckney, 1996). Estas asociaciones (cianobacterias-bacterias-diatomeas) pueden tener diferentes aplicaciones ambientales y biotecnológicas (Wartiainen *et al.*, 2008).

8.2 ETAPA 2. Actividad metabólica del CM

Para considerar al CM como un biofertilizante capaz de aportar diferentes nutrientes a la planta se estudió la posible actividad metabólica del mismo, mediante la actividad de fosfatasa, un análisis microbiológico y la capacidad de producir promotores crecimiento.

8.2.1 Actividad de fosfatasa

El fósforo es un elemento fundamental para el crecimiento vegetal, pero es uno de los menos disponibles en el suelo debido a que se encuentra principalmente en

formas no asimilables, por lo que se han buscado diversas estrategias para resolver este problema, como lo es el uso de microorganismos capaces de solubilizar fosfatos inorgánicos, mediante la producción de ácidos orgánicos, agentes quelantes, y de la liberación de enzimas como fosfatasa, fitasa y fosfonatasas (Alarcón y Ferrera, 2000). Entre los géneros bacterianos más estudiados por su capacidad para solubilizar fosfatos se encuentran *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Azotobacter* y *Erwinia* los cuales se han aislado de la rizósfera de plantas (Rodríguez y Fraga, 1999).

La capacidad de solubilizar fósforo del CM se cuantificó mediante la actividad de las enzimas fosfomonoesterasa (PMEasa) y fosfodiesterasa (PDEasa) al producir para nitrofenol (pNP) (Chróst y Krambeck, 1986).

Los valores obtenidos de la actividad de ambas enzimas al final del cultivo por lote del CM fueron 27 nmoles de pNP mg^{-1} clorofila a h^{-1} (15482 nmoles de pNP mg^{-1} peso seco h^{-1}) para PMEasa y 22 nmoles de bis-pNP mg^{-1} clorofila a h^{-1} (20441 nmoles de bis-pNP mg^{-1} peso seco h^{-1}) para PDEasa. En la Tabla 9 se presenta la actividad de fosfatasa de diversas cianobacterias, diatomeas y bacterias que han sido reportadas como organismos capaces de solubilizar fósforo. El valor de actividad de fosfatasa del CM en función del peso seco de biomasa resultó inferior de 4 a 15 veces para pNP y de 3 a 9 veces para bis-pNP a lo reportado por Whitton *et al.* (1991), quienes caracterizaron la actividad de fosfatasa de *Anabaena* sp. a partir de muestras de suelo y agua de anegamiento de un campo arrocero utilizando un medio sin fósforo; pero resultan superiores de 130 a 190 veces a lo reportado por Banerjee y John (2005) para pNP y bis-pNP

respectivamente de *Rivularia*, una cianobacteria utilizada como biofertilizante en campos de arroz.

La mayor actividad de fosfatasa se ha reportado en condiciones de deficiencia de fósforo biodisponible para el crecimiento del microorganismos (Hadas *et al.*, 2013). La actividad de fosfatasa reportada en el presente estudio es inferior a los valores reportados en la literatura, debido a que el medio de cultivo empleado para el crecimiento y propagación del CM tiene suficiente K_2HPO_4 disponible para el crecimiento de los organismos que lo componen.

Tabla 9. Actividad de fosfatasa de diferentes microorganismos

Microorganismo	Procedencia	pNP	Bis-pNP	Referencia
Fitoplancton compuesto por: <i>Anabaena</i> sp. <i>Nannocystis</i> sp. <i>Anabaena helecooides</i> y <i>Cystidium</i> sp.	Lago Calado (Cuenca del Amazonas)	2.64×10^{12} nmol pNP mg^{-1} Chl a h^{-1}		Setaro y Melack, 1984
<i>Anabaena</i> sp.	Suelo	238 000 nmol PNP mg^{-1} peso seco h^{-1}	182 000 nmol bis- PNP mg^{-1} peso seco h^{-1}	Whitton <i>et al.</i> , 1991
<i>Anabaena</i> sp.	Agua anegada en un campo arrocero	68 000 nmol PNP mg^{-1} peso seco h^{-1}	78 000 nmol bis- PNP mg^{-1} peso seco h^{-1}	Whitton <i>et al.</i> , 1991
<i>Chlorella</i> sp.	Río Vaal (Sudáfrica)	3×10^6 nmol pNP mg^{-1} Chl a h^{-1}		Kruskopf y Plessis, 2004
<i>Rivularia</i>	Campos de arroz de Uttar Pradesh (India)	118 nmol PNP mg^{-1} peso seco h^{-1}	107 nmol bis-PNP mg^{-1} peso seco h^{-1}	Banerjee y John, 2005
<i>Aphanizomenon</i> <i>ovalisporum</i>	Lago Kinneret	38×10^5 nmol PNP mg^{-1} Chl a h^{-1}		Hadas <i>et al.</i> , 2013

La posibilidad de utilizar microorganismos solubilizadores de fosfato como estrategia de fertilización biológica para los cultivos, ofrece grandes perspectivas

de aplicación agrícola al disminuir costos en fertilizantes, además de que dichos microorganismos intervienen directamente incrementando la capacidad de crecimiento de las especies vegetales en las que son inoculados.

8.2.2 Análisis microbiológico

Los resultados del análisis microbiológico del CM en los diferentes medios de cultivo se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Análisis microbiológico del CM en medios diferenciales

Fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 11 L					
Medio diferencial	UFC (Dilución 10^{-3})	UFC (Dilución 10^{-4})	UFC (Dilución 10^{-5})	UFC (Dilución 10^{-6})	UFC (Dilución 10^{-7})
Agar nutritivo		incontables	incontables	4×10^7	SC
Rennie	130×10^4	8×10^5	SC	SC	
Pikovskaya	SC	SC	SC	SC	
Prueba de auxinas	Positiva en 15 de 21 colonias				

UFC: unidades formadoras de colonia; **SC:** sin crecimiento

En los resultados que se muestran en la Tabla 10 es posible observar una abundancia de microorganismos fijadores de nitrógeno cuya presencia en el CM se hizo evidente al final del cultivo por lote (día 14). Lo anterior, debido a que en el medio Rennie se obtuvo valores elevados de unidades formadoras de colonia en las diluciones más bajas. En el medio de cultivo Pikovskaya no se observó la formación de halos hidrolíticos en ninguna de las diluciones ensayadas, debido probablemente a que el medio de cultivo utilizado para el crecimiento del CM contiene suficiente fósforo inorgánico, por lo que no es necesaria la activación de las enzimas que realizan el proceso de hidrólisis de fuentes de fósforo más complejas; o fuentes orgánicas de fósforo como las utilizadas para el ensayo de actividad de fosfatasa, que resultó positivo aunque su valor fue bajo. Lo antes mencionado ha sido previamente reportado en la literatura por Stihl *et al.* (2001),

quienes demostraron la capacidad de diferentes cianobacterias para excretar fosfatasa extracelulares cuando se encuentran sometidas a largos periodos de limitación de fósforo y que con frecuencia liberan fosfato inorgánico a partir de substratos orgánicos de fósforo, ya que este tipo de complejos no pueden ser transportados a través de la membrana celular.

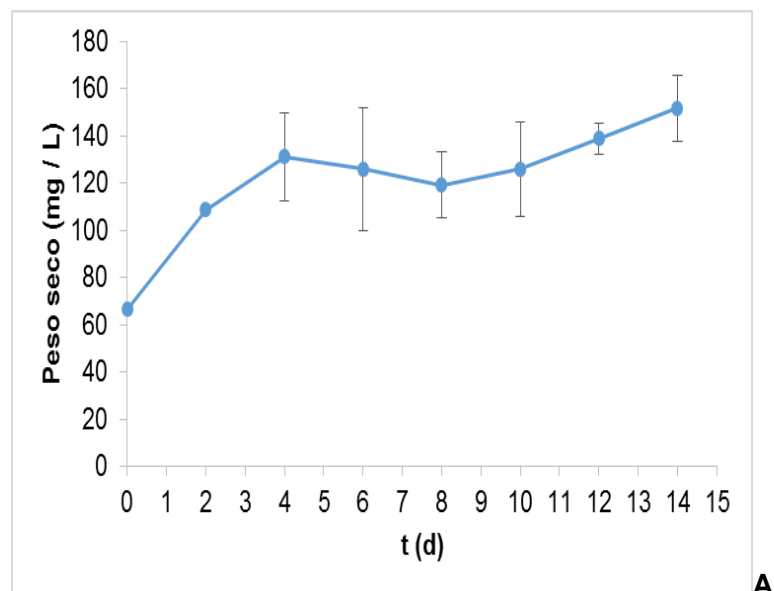
A partir de las colonias obtenidas en Agar nutritivo, se llevó a cabo la determinación cualitativa de la presencia de indoles totales posterior a su crecimiento en LB utilizando el reactivo de Salkowski, obteniéndose resultados positivos en 15 de las 21 colonias seleccionadas, mismas que presentaron una coloración rosa. Dentro de los indoles totales detectados por esta técnica se encuentra el ácido indol acético (IAA), que ha sido reportado como uno de los principales promotores del crecimiento de raíces en diferentes cultivos agrícolas (Ludwig-Müller 2011). El efecto de la síntesis y liberación del IAA por diferentes bacterias y cianobacterias en cultivos de arroz y trigo, ha sido reportado para cepas de *Rhodobacter* sp. (Rajasekhar *et al.*, 1999; Gamal y Elbanna, 2011), *Anabaena* (Hashtroudi *et al.*, 2012; Rana *et al.*, 2012; Prasanna *et al.*, 2009) *Nostoc* (Hashtroudi *et al.*, 2012; Prasanna *et al.*, 2009; Karthikeyan *et al.*, 2007) y *Leptolyngbya* sp. (Ahmed *et al.*, 2010; Babu *et al.*, 2013); estos organismos conforman el CM bajo estudio.

Una vez conocidos los componentes eucariotes y procariotes que conforman el CM y habiendo estudiado su potencial para solubilizar fósforo y producir promotores de crecimiento, se consideró necesario llevar a cabo su producción en un fotobiorreactor tipo *air-lift* de cara plana de 50 L para evaluar diferentes parámetros que pudieran afectar su desempeño biológico.

8.3 ETAPA 3. Producción en lote del CM en un FBR de 50 L

En la Tabla 11 y figura 8 se presentan los resultados globales del desempeño biológico del CM en el FBR de 50 L a través del tiempo.

En la figura 8A se observa que partiendo de una concentración inicial de biomasa en base seca de 66 mg L^{-1} , fue posible alcanzar al día 14, un valor máximo de 152 mg L^{-1} , una productividad de $0.25 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una velocidad específica de crecimiento de 0.028 d^{-1} . En la figura 8B se muestra el contenido de clorofila *a* respecto al tiempo y se observa un aumento exponencial a partir del día 6 sostenido hasta el final del cultivo por lote para alcanzar al día 14, una concentración final de 2.3 mg L^{-1} . Lo anterior indica un incremento de los organismos fotosintéticos que conforman el CM, a lo largo del cultivo por lote.



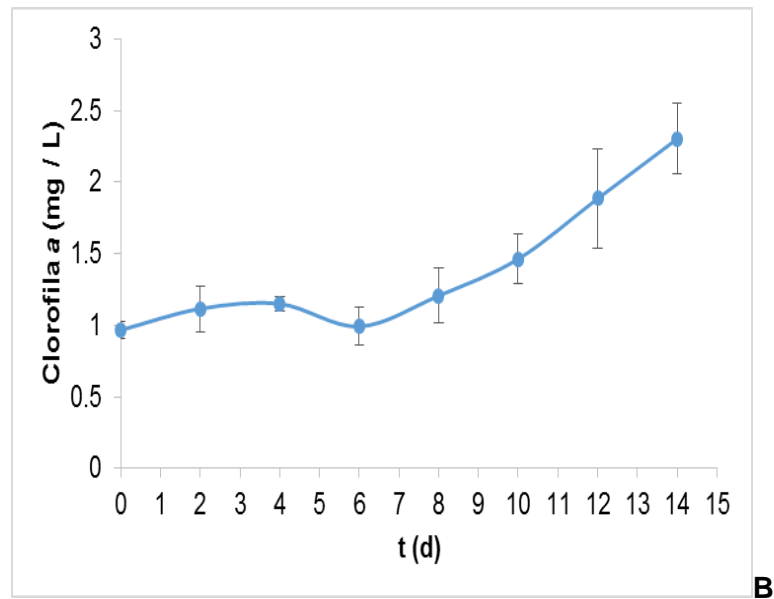


Figura 8. Crecimiento (A) y contenido de Clorofila a (B) vs tiempo en el FBR de 50 L (n=3)

La concentración final de PO_4^{-3} fue de 18 mg L^{-1} al día 14 en cultivo por lote en el FBR de 50 L, con un consumo específico de $0.00088 \text{ mg / mg biomasa h}$, lo que indica que este nutriente no fue limitante para el crecimiento del CM en el FBR (Tabla 11).

En la Tabla 11 se muestra la variación del pH a través del tiempo en el FBR, misma que osciló entre 7.7 y 7.9; estos valores se encuentran dentro del rango de pH (6-10) para el crecimiento de cada uno de los microorganismos que conforman el CM (Tabla 12). El pH del medio es un parámetro importante ya que cada uno de los organismos que conforman el CM funcionan de manera adecuada a diferente pH; además de que su variación a través del tiempo puede afectar el metabolismo, la productividad de las cianobacterias y el funcionamiento de algunas enzimas (Touloupakis *et al.* 2016). Tal es el caso del complejo enzimático nitrogenasa presente en las cianobacterias que conforman al CM, el cual debe mantener un pH neutro para su correcto funcionamiento (Tsygankov *et al.* 1997; Masukawa *et al.*, 2014)

En la Tabla 11 se presenta la variación de la concentración de NO_3^- y NH_4^+ en el FBR de 50 L. Los valores de concentración más elevados fueron 0.1 y 1.41 mg L^{-1} de nitratos y amonio respectivamente, los cuales son inferiores a las concentraciones reportadas en literatura, inhibitorias del funcionamiento del complejo enzimático nitrogenasa (1240 mg L^{-1} de NO_3^- y 18 mg L^{-1} de NH_4^+) (Almon y Boger, 1988; Li *et al.*, 2010). La enzima encargada del proceso de fijación de nitrógeno no se vio afectada por la presencia de estos elementos (NO_3^- y NH_4^+) en el medio de cultivo.

El máximo valor específico de actividad de nitrogenasa se obtuvo al día 10 y fue de 34817 $\text{nmol eteno / g peso seco h}$ (Tabla 11); este valor es de 13 a 15 veces superior a lo reportado en literatura para *Anabaena variabilis* Sao (2678 nmol eteno g^{-1} peso seco h^{-1}) y *Nostoc muscorum* DOH (2237 nmol eteno g^{-1} peso seco h^{-1}) respectivamente (Kannaiyan *et al.*, 1997; Kannaiyan, 2002b); lo que nos indica una mayor eficiencia de fijación de nitrógeno del CM respecto a cepas puras.

Tabla 11. Resultados globales del desempeño biológico del CM en el FBR de 50 L

Concentración final de PO_4^{3-} (mg L^{-1})	Consumo PO_4^{3-} ($\text{mg / mg peso seco h}$)	Variación NH_4^+ (mg L^{-1})	Variación NO_3^- (mg L^{-1})	pH	Actividad de nitrogenasa (nmol eteno / L h)	Actividad de nitrogenasa ($\text{nmol eteno / g peso seco h}$)
18	0.00088	0.15-1.41	0.03-0.1	7.7-7.9	1983-4384	34817

Una vez que se analizaron los parámetros que pudieron afectar el desempeño biológico del CM en el FBR de 50 L, se llevó a cabo su escalamiento y producción en fotobiorreactores de igual configuración pero de diferente volumen, por lo que previo a su operación con el CM se llevó a cabo su caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa.

Tabla 12. Condiciones de cultivo reportadas en la literatura para cada uno de los microorganismos que conforman el CM

Organismo	Medio de cultivo	μ (d^{-1})	Luz ($\mu\text{mol foto- nes m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Tempe- ratura ($^{\circ}\text{C}$)	pH	Volumen (mL)	Lugar de aislamiento	Referen- cia
<i>Anabaena</i> sp.	Chu 10	1.25	250	28-32		matraces de 250	Lago Biwa (Japón)	Nalewaj ko y Murphy, 2001
<i>Anabaena</i> sp.	BG-11	0.09 0.02	110	28-30	6-10	matraces de 250	Colección microbiana (España)	Morales <i>et al.</i> , 2002
<i>Anabaena oscillarioides</i> RPAN69	BG-11 ₀		50-55	28	7.5	Matraces de 250	Instituto de Investiga- ción Agrícola (India)	Chaudh ary <i>et al.</i> , 2012
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	BG-11 ₀	0.52	150	20	6.9- 7.4	matraces de 1000	Lago Brielse Meer (Países Bajos, Europa)	De Nobel <i>et al.</i> , 1997
<i>Aphanizomenon aphanizomenoi des</i>	Z8 modifi- cado	0.36	80	28		matraces de 250	Lago Heiliger See (Alemania)	Mehnert <i>et al.</i> , 2010
<i>Aphanizomenon ovalisporum</i>	BG-11	0.2- 0.3	40-100	26-30	7- 9	matraces de 150	Lago Kinneret (Israel)	Hadas <i>et al.</i> , 2013
<i>Leptolyngbya foveolarum</i>	WC modifi- cado	0.4	35 ± 5	25	7	matraces de 100	Sedimentos del río Rhin (Alemania)	van der Grinten <i>et al.</i> , 2005
<i>Leptolyngbya</i> BL0902	BG-11		125- 500	22-40	8-11	Matraces de 250	Laguna abierta (Valle Imperial, EUA)	Taton <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptolyngbya</i> sp.	Basal de Bold	0.23	310- 400	25±2	7-8	Matraces de 2000	Lago College (Louisiana)	Silaban <i>et al.</i> , 2014
<i>Chlorella</i> sp.	BG-11	0.33	16.3	18		matraces de 200	Río Vaal (Sudáfrica)	Kruskopf y Plessis, 2004
<i>Chlorella</i> sp.	f/2 modifi- cado	0.6	300	26		Fotobiorre actor de 800	Instituto de Investiga- ción Pesquera (Taiwan)	Chiu <i>et al.</i> , 2008
<i>Chlorella vulgaris</i>	Basal de Bold	0.23	310- 400	25±2	7-8	Matraces de 2000	Lago College (Louisiana)	Silaban <i>et al.</i> , 2014
<i>Monoraphidium</i> sp.	COM- BO		100	25	7-7.2	matraces de 250	Agua dulce (Alemania)	Patel <i>et al.</i> , 2012

Tabla 12. *Continuación*

<i>Monoraphidium</i> sp.	BG-11	0.15	70	25		matraces de 1000	Lago Fuxian (China)	Yu <i>et al.</i> , 2012
<i>Monoraphidium minutum</i>	WC	0.75	80	20-32		matraces de 250	Universidad de Konstanz (Alemania)	Lürling <i>et al.</i> , 2013
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	WC modificado	0.78	100	20		matraces de 500	Lago Ohrid (Yugoslavia)	Tilman y Kilham , 1976
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	Schlösser's modificado	0.95	125	25		matraces de 500	Río Danubio (Unión Europea)	Shafik <i>et al.</i> , 1997
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	WH	0.92	130	20	7.4-8.4	Botellas de 2000	Agua dulce de estuario (Francia)	Roubeix y Lancelot ,2008
<i>Melosira varians</i>	WC modificado	0.63	100		7.6	Placa de múltiples pozos	Agua dulce Loras College Freshwater, Colección de cultivos de diatomeas (EUA)	Tuji, 2000
<i>Melosira varians</i>	WC modificado		50	20	7	matraces de 1000	Sedimento del río Waal (Países Bajos, Europa)	Van der Grinten <i>et al.</i> , 2004
<i>Melosira varians</i>	COMBO modificado		solar	27-32		Botellas Nalgen de 250	Planckton del río Ohio (EUA)	Clarson <i>et al.</i> , 2009
<i>Cocconeis placentula</i>	WC modificado	0.59	100		7.6	Placa de múltiples pozos	Agua dulce Loras College Freshwater, Colección de cultivos de diatomeas (EUA)	Tuji, 2000
<i>Cocconeis placentula</i>	Agua corriente		solar	8.3-16.3	6.1-8	Matraces de 250	Agua corriente (Suecia)	Kovács <i>et al.</i> , 2006
<i>Cocconeis placentula</i>	Agua de río			15	6.8-7.5	Placas de petri de 20	Río Tota (Colombia)	Abuhat y Donato , 2012

Tabla 12. Continuación

<i>Achnantheidium clidanos</i>	Agua corriente		solar		7	Matraces de 250	Agua corriente (Suecia)	Kovács <i>et al.</i> , 2006
<i>Navicula pelliculosa</i>	CHU-10 modificado	0.5	100	25	6.4	matraces de 250	Colección microbiana, Universidad de Cambridge (Reino Unido)	Chalifour y Juneau, 2011
<i>Nitzschia perminuta</i>	WC modificado	0.65	35 ± 5	25	7	matraces de 100	Sedimentos del río Rhin (Alemania)	van der Grinten <i>et al.</i> , 2005
<i>Nitzschia</i>	Czarnecki CR1		solar	27-32		matraces de 100	Lago Cumberl (EUA)	Clarson <i>et al.</i> , 2009
<i>Nitzschia</i> sp.	D1 modificado		40	22		matraces de 500	Agua dulce, Colección de cultivos de algas del Instituto de Hidrobiología (China)	Zhang <i>et al.</i> , 2013
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U. 001	Biebl y Pfe-nnig modificado	1.056	150 – 250	32	7	Fotobio-reactor tipo columna de 400	Colección microbiana, Universidad de Osmania (India)	Koku <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	RCV	3.36		26-34		Reactor de 1000	Colección microbiana	He <i>et al.</i> , 2006
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864)	SB modificado	1.48	solar	32	7-10	Fotobio-reactor flat panel de 6500	Colección microbiana de la Universidad de Osmania (India)	Eroğlu <i>et al.</i> , 2008
<i>Devosia insulae</i>	Agar nutritivo			10-31	6.5-7.5	Placas de petri de 20	Suelo de Dokdo (Corea)	Yoon <i>et al.</i> , 2007
<i>Methylibium petroleiphilum</i>	Medio mineral (MSM)			30	6.5	Placas de petri de 20	biofiltro (Los Angeles, EUA)	Nakatsu <i>et al.</i> , 2006

8.4 ETAPA 4. Escalamiento ascendente y descendente del FBR de 50 L a un volumen de 150 L y de 16 L

En la figura 9 se muestran las imágenes de los FBR de 150 L (A) y 16 L (B) respectivamente.

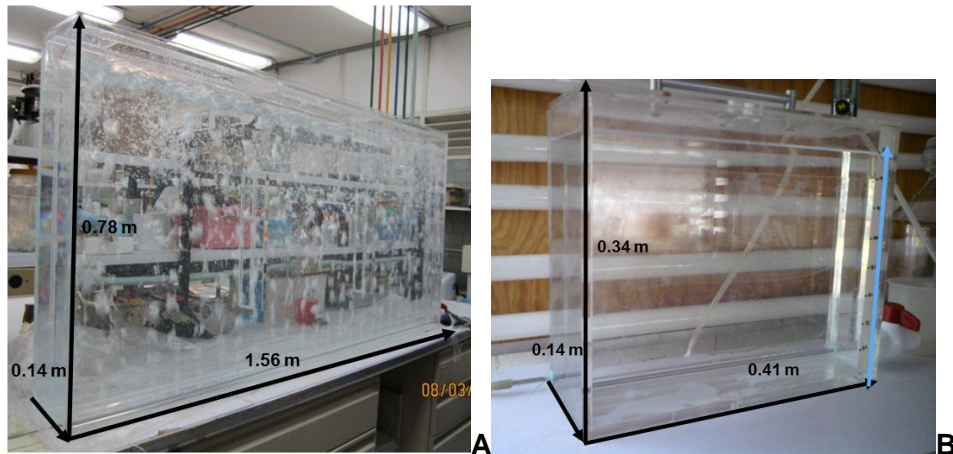


Figura 9. Fotobiorreactor tipo air-lift de cara plana de 150 (A) y 16 L (B)

La productividad en los FBR de 16, 50 y 150 L fue de 0.79, 0.25 y 0.36 mg / L h respectivamente. La densidad del líquido en el sistema trifásico fue de 999 Kg m^{-3} para los tres FBR al finalizar el cultivo por lote.

8.4.1 Tiempo de mezclado

La figura 10 muestra la relación entre la velocidad superficial del gas y el tiempo de mezclado en un sistema bifásico en los FBR de 16 y 150 L, misma que presenta un cambio de pendiente a una U_G de 0.0029 y 0.0068 m s^{-1} respectivamente. Los tiempos de mezclado en las velocidades superficiales de gas mencionadas previamente fueron 52.5 s para el FBR de 16 L y 103.8 s para el de 150 L; la diferencia de valores entre ambos FBR dependió del volumen, el flujo de aire y la altura del reactor, parámetros que determinan el tiempo necesario para llevar a cabo la distribución de nutrientes, disipación del calor generado dentro del FBR, además de que facilitan el movimiento de las células dentro y

fuera de la parte iluminada del FBR y mejoran la transferencia de masa (Ogbonna *et al.*, 1996). El valor del tiempo de mezclado encontrado en el presente estudio para el FBR de 150 L fue 2 veces inferior a lo reportado por Sierra *et al.* (2008), quienes caracterizaron un fotobiorreactor de cara plana de 250 L, utilizando una velocidad superficial de gas de 0.0076 m s^{-1} en un sistema bifásico para la producción de microalgas. Además, Hsieh y Wu (2009) reportaron un tiempo de mezclado de 110 s con una velocidad superficial de gas de 0.0020 m s^{-1} para un fotobiorreactor con cámaras rectangulares transparentes de 18 L, de configuración semejante a la del presente trabajo donde utilizaron una relación A/V igual a 7.17 m^{-1} y un recorrido lumínico de 0.14 m para su diseño. El valor del tiempo de mezclado reportado por estos autores fue 2 veces superior a lo obtenido en el presente trabajo para el FBR de 16 L.

Por lo anterior, se sugiere que los FBR propuestos para la producción del consorcio microbiano fotosintético, fueron capaces de distribuir de manera homogénea los nutrientes dentro del sistema en menor tiempo, utilizando velocidades superficiales de gas similares a lo reportado en la literatura.

No fue posible determinar con precisión el tiempo de mezclado en el sistema trifásico, debido a que el pH del medio de cultivo del CM se mantuvo en un rango de 9 a 10 durante el cultivo por lote, lo que causó interferencia en la estabilización del ácido y la base utilizados en la determinación del tiempo de mezclado por el método del trazador ácido. Sin embargo, dado que no existen cambios significativos en la densidad del líquido en el sistema trifásico y bifásico, se esperaría que el tiempo de mezclado no presentara grandes diferencias respecto al tiempo entre ambos sistemas (Camacho *et al.*, 2004).

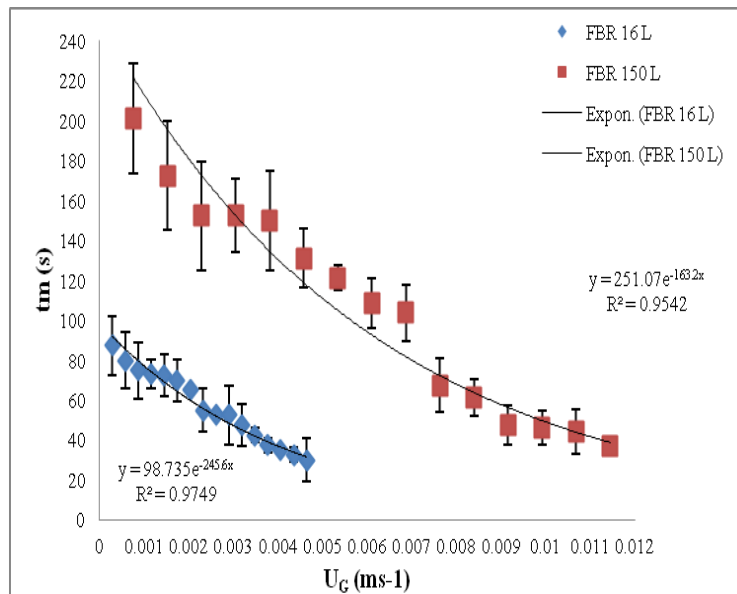


Figura 10. U_G vs t_m en los FBR de 16 y 150 L en un sistema bifásico

8.4.2 Gas hold-up (ϵ)

En la figura 11 se muestra la relación entre la velocidad superficial de gas (U_G) y el gas hold-up en los FBR en un sistema bifásico y trifásico, y se observa un aumento directamente proporcional de ϵ al aumento en el flujo de aire suministrado al fotobiorreactor. Los valores de ϵ donde se muestra un cambio de pendiente respecto a U_G para el sistema bifásico en los FBR de 16 y 150 L fueron 0.025 y 0.046 respectivamente; los valores de U_G donde encontramos el cambio de pendiente para ϵ en estos dos FBR coinciden con los mencionados anteriormente para el t_m .

La tendencia al incremento de ϵ posterior al cambio de pendiente, se debió probablemente a la coalescencia de las burbujas de gas de aire en el FBR, la cual se incrementa a valores superiores de 0.0020 y 0.0068 m s⁻¹ donde se observa el punto de inflexión. Ya que el agua es un medio coalescente, el tamaño y la velocidad de ascenso de las burbujas se incrementan, por lo tanto el tiempo de residencia del gas en el líquido disminuye teniendo un efecto negativo sobre el valor de ϵ .

Para el sistema trifásico se determinó este parámetro en los tres FBR utilizando como modelo de estudio el CM y se encontraron cambios de pendiente a valores de U_G de 0.0029, 0.0042 y 0.0068 m s^{-1} para los FBR de 16, 50 y 150 L respectivamente. Los valores de ϵ en estos puntos fueron de 0.034, 0.020 y 0.048 para cada uno de los FBR mencionados anteriormente. La cuantificación de ϵ es importante debido a que de manera general, la expansión volumétrica de gas en fotobiorreactores permite caracterizar fenómenos de transporte en sistemas de agitación neumática.

El gas hold-up se ve afectado por altas presiones y la presencia de partículas en el líquido, y generalmente aumenta con el incremento de la velocidad superficial de gas (U_G) (Chisti y Moo, 1988a; Luo *et al.*, 1997). En el presente estudio se mostró un comportamiento similar en la relación U_G vs ϵ en los tres FBR, al incrementarse el valor de ϵ en el sistema trifásico por la presencia de la tercera fase (CM), la cual probablemente ayuda a disminuir el tamaño de burbuja y evita la coalescencia de las mismas, disminuyendo así su potencia de propulsión hacia la superficie (Chisti y Moo, 1988a; Luo *et al.*, 1997). Además, el CM mostró previamente la capacidad de formar agregados celulares agrupados por una matriz de exopolisacárido producida por el cultivo. Estos aglomerados celulares disminuyen en proporción y tamaño al aumentar la escala del FBR, debido probablemente al esfuerzo de corte generado en cada uno de ellos, al aumentar el flujo de aire suministrado. El FBR de 16 L presentó una mayor cantidad de agregados celulares comparado con los FBR de mayor escala (50 y 150 L); estos agregados pueden llegar a retener más tiempo en el líquido a las burbujas de aire, probablemente por la adherencia de las mismas a su superficie, aumentando así el tiempo de residencia de las burbujas dentro del FBR y por lo tanto

incrementando el valor de ε (Galaction *et al.*, 2010). Por lo anterior, los valores de ε fueron superiores en este FBR en el sistema trifásico, comparado con los FBR de 50 y 150 L.

En el presente estudio, los valores de ε en los puntos de inflexión para el sistema bifásico en los FBR de 16 y 150 L fueron de 1 a 2 veces superiores a lo reportado por Reyna-Velarde *et al.* (2010) y aproximadamente 2 veces inferiores en el sistema trifásico para el FBR de 50 L, trabajando con la misma U_G . Debido a que el CM utilizado para la tercera fase presentó una menor concentración celular y un tamaño de partícula diferente al de *Spirulina* sp., cambiaron las propiedades reológicas del sistema bajo estudio comparado con lo reportado por Reyna-Velarde *et al.* (2010). Sin embargo la propiedades reológicas en el FBR de 150 L en el sistema bifásico y trifásico fueron similares entre ellas.

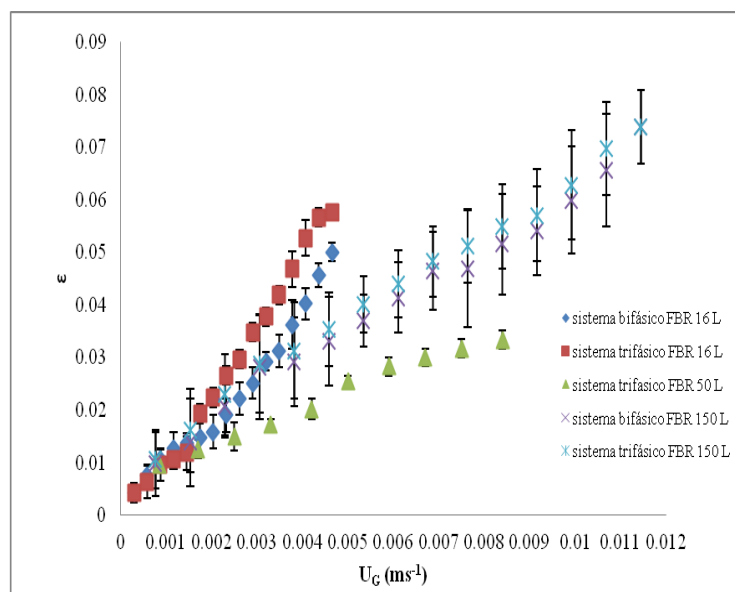


Figura 11. U_G vs ε en los FBR de 16, 50 y 150 L en un sistema bifásico y trifásico

8.4.3 Coeficiente volumétrico de transferencia de masa

En la figura 12 se muestra la relación entre U_G y $k_L a$ para los FBR de 16 y 150 L en un sistema bifásico y trifásico, y para el FBR de 50 L en un sistema trifásico, observando los mismos cambios de pendiente en los valores de U_G (0.0029,

0.0042 y 0.0068 m s⁻¹ para el FBR de 16, 50 y 150 L respectivamente) mencionados previamente para ε en el sistema bifásico y trifásico en los tres FBR. La relación volumen de aire por volumen de medio por minuto (vvm) y el k_{La} para los tres FBR en un sistema bifásico y trifásico utilizando el CM como modelo de estudio, presenta cambios de pendiente en un rango de 0.5-0.6 vvm (Fig. 13), lo que demuestra que aunque el volumen de los FBR sea diferente, al conservarse la configuración se favorece que las características hidrodinámicas y de transferencia de masa sean similares entre los FBRs. Lo anterior puede ayudar al escalamiento de la producción del CM. En los FBR de 16 y 150 L no se observó una diferencia significativa de los valores de k_{La} entre el sistema bifásico y trifásico, lo anterior se debió probablemente a que la densidad del líquido entre ambos sistemas fue similar ya que en el CM utilizado como modelo, no se presentó una alta densidad celular y por lo tanto las propiedades reológicas del sistema probablemente no cambiaron significativamente a través del tiempo. De acuerdo a la figura 10 posterior al punto de inflexión mostrado para los FBR de 16 y 50 L se observó una fase asintótica indicando que no existe un aumento significativo del k_{La} con respecto al incremento de la velocidad superficial del gas. Lo anterior se debió probablemente a que en este tipo de reactores a U_G superiores al cambio de pendiente, se incrementa el número de burbujas en el fluido favoreciendo la coalescencia de las mismas. Al tener burbujas más grandes en el líquido, se origina un incremento de ε tal como se muestra en la figura 9 y probablemente una disminución del valor del área interfacial (a) para la transferencia de masa, lo que evita un aumento del k_{La} (Chisti y Moo, 1988b). En el FBR de 150 L se observó un incremento del valor de k_{La} con respecto a U_G posterior al cambio de pendiente, presentando un régimen turbulento a partir de

una velocidad superficial de gas de 0.0076 m s^{-1} , lo que puede provocar una disminución de la velocidad de crecimiento de los microorganismos debido al aumento excesivo del esfuerzo de corte y del estrés hidrodinámico, lo que provoca daño celular en las microalgas (Issarapayup *et al.*, 2009; Pulz, 2001), además de que se requiere un alto consumo de energía para el suministro de aire al FBR (Contreras *et al.*, 1998), tal como se puede observar en la figura 14, donde posterior al cambio de pendiente el valor de P/V aumenta un 40 % lo que implica un mayor gasto de potencia, por lo que no se recomienda operar este FBR a velocidades superficiales de gas superiores al cambio de pendiente mostrado en la figura 12.

En la Tabla 13 se muestran diferentes valores de k_{La} reportados en la literatura para diferentes configuraciones de fotobiorreactores y su comparación con los valores encontrados en el presente estudio. Los valores de k_{La} encontrados para los FBR de 16 y 150 L en el sistema bifásico resultaron 1.5 a 2 veces superiores a lo reportado por Babcock *et al.* (2002) quienes trabajaron con un fotobiorreactor tubular tipo air-lift de 220 L, pero inferiores de 1 a 2 veces a lo reportado por Reyna-Velarde *et al.* (2010) y Sierra *et al.* (2008), quienes trabajaron con fotobiorreactores de cara plana tipo air-lift; a pesar de que la configuración presentada por estos últimos dos autores es similar a la del presente estudio, los valores óptimos de k_{La} que ellos reportan fueron encontrados a velocidades superficiales de gas de 1 a 2 veces superiores a las reportadas en el presente trabajo, lo que representa un mayor gasto de potencia suministrada al fotobiorreactor.

El coeficiente de transferencia de masa en el sistema trifásico para el FBR de 16 L resultó 8 veces inferior a lo reportado por Hu *et al.* (1996), quienes

caracterizaron un fotobiorreactor modular inclinado de cara plana utilizando *Spirulina platensis* como tercera fase y una velocidad superficial 10 veces superior al presente estudio. Además, los valores de k_{La} en los FBR de 50 y 150 L resultaron 1.3 a 1.6 veces inferiores a lo reportado por Reyna-Velarde *et al.* (2010) para un sistema trifásico, quienes caracterizaron un fotobiorreactor de configuración semejante al del presente estudio, utilizando una velocidad superficial de gas de 0.0051 m s^{-1} ; la variación de k_{La} en sistema trifásico en fotobiorreactores de diferente configuración incluyendo los cara plana, depende de la tercera fase utilizada. En el presente estudio se utilizó el CM como fase biológica (tercera fase), el cual tiene una gran diversidad de microorganismos además de la capacidad de formar aglomerados celulares por acción de la matriz de exopolisacárido secretada, por lo tanto, las propiedades reológicas del fluido a caracterizar son diferentes comparadas con la fase biológica empleada por Reyna-Velarde *et al.* (2010), quien utilizó cultivo puro de *Spirulina* sp. que es un organismo filamentosos. Además Kaewpintong *et al.* (2007) mencionan que los valores de k_{La} en función de la velocidad superficial de gas varían considerablemente dependiendo de la escala y geometría del fotobiorreactor, así como de la cepa de estudio.

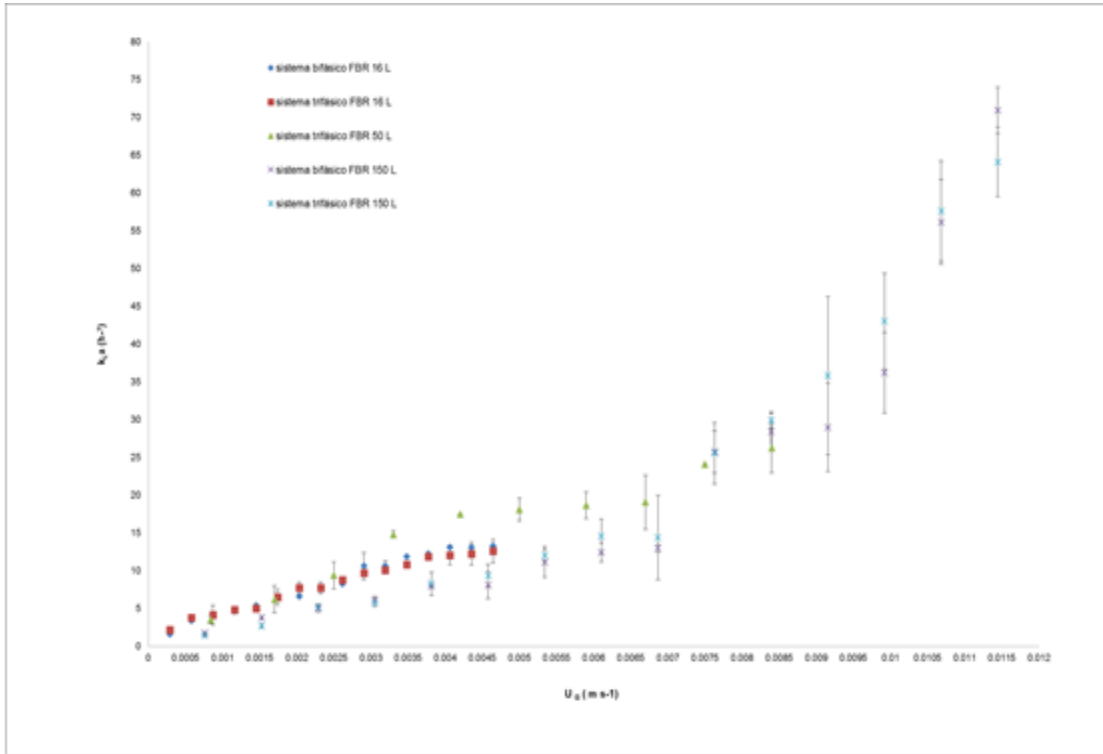


Figura 12. U_G vs $k_{L,a}$ en los FBR de 16, 50 y 150 L en un sistema bifásico y trifásico

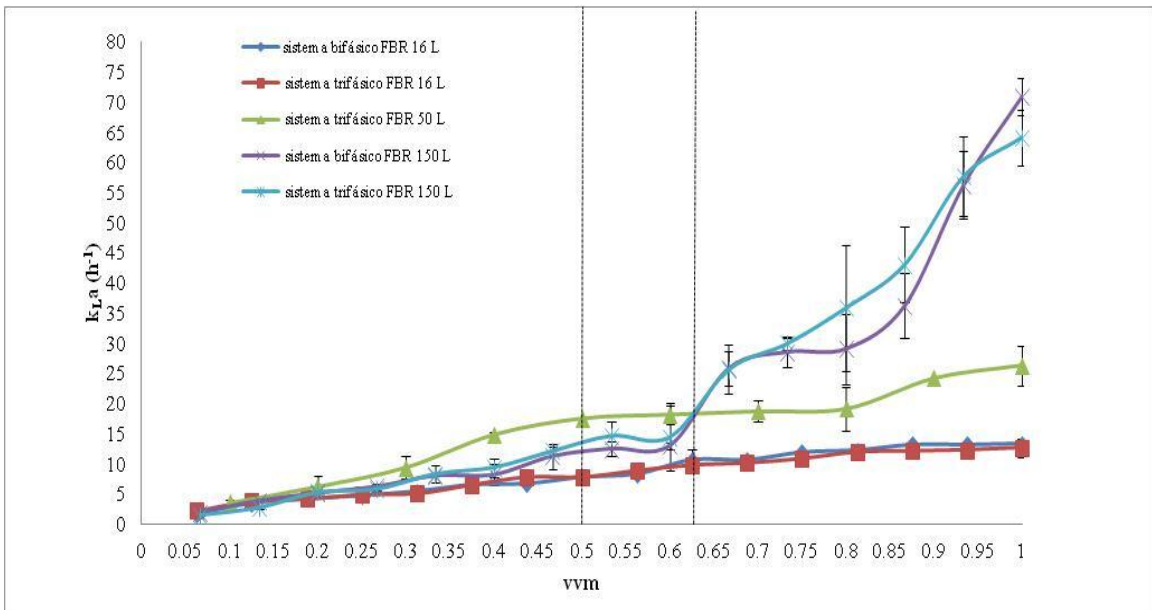


Figura 13. vvm vs $k_{L,a}$ en los FBR de 16, 50 y 150 L en un sistema bifásico y trifásico

Tabla 13. k_{La} en diferentes fotobiorreactores

Tipo fotobiorreactor	U_g (ms^{-1})	k_{La} (h^{-1})	Sistema	Referencia
FBR de cara plana tipo air-lift de 16 L	0.0029	10.62	Bifásico	Presente trabajo
FBR de cara plana tipo air-lift de 150 L	0.0068	12.96	Bifásico	Presente trabajo
FBR de cara plana tipo air-lift de 50 L	0.0051	18	Bifásico	Reyna-Velarde <i>et al.</i> , 2010
Fotobiorreactor de cara plana tipo air-lift de 250 L	0.0076	22.68	Bifásico	Sierra <i>et al.</i> , 2008
Fotobiorreactor tubular tipo air-lift de 220 L	0.03	7	Bifásico	Babcock <i>et al.</i> , 2002
FBR de cara plana tipo air-lift de 16 L	0.0029	9.72	Trifásico (CM)	Presente trabajo
FBR de cara plana tipo air-lift de 50 L	0.0042	17.48	Trifásico (CM)	Presente trabajo
FBR de cara plana tipo air-lift de 150 L	0.0068	14.4	Trifásico (CM)	Presente trabajo
FBR de cara plana tipo air-lift de 50 L	0.0051	24.1	Trifásico (<i>Spirulina</i> sp.)	Reyna-Velarde <i>et al.</i> , 2010
Fotobiorreactor modular inclinado de cara plana (FIMP) de 16 L	0.02916	80	Trifásico (<i>Spirulina platensis</i>)	Hu <i>et al.</i> , 1996

8.4.4 Potencia volumétrica (P/V)

La relación de k_{La} y P/V se muestra en la figura 14 donde es posible observar que el comportamiento de ambos sistemas en los tres fotobiorreactores fue similar al mostrado para la relación k_{La} vs v_{vm} (Fig. 13) con los mismos cambios de pendiente mencionados previamente a U_G igual a 0.0029, 0.0042 y 0.0068 $m s^{-1}$ que corresponden a 14.2, 20.5 y 33.6 $W m^{-3}$ respectivamente. Lo anterior sugiere no operar los FBR por encima de los puntos de inflexión ya que de hacerlo, implicaría un gasto de potencia innecesario por que el valor de k_{La} no aumenta

significativamente más allá del punto de inflexión en los FBR de 16 y 50 L. Adicionalmente, en el FBR de mayor volumen (150 L) utilizar una velocidad superficial de gas superior a la mencionada previamente, genera turbulencia dentro del sistema y provoca ruptura celular de las cianobacterias filamentosas que conforman el CM.

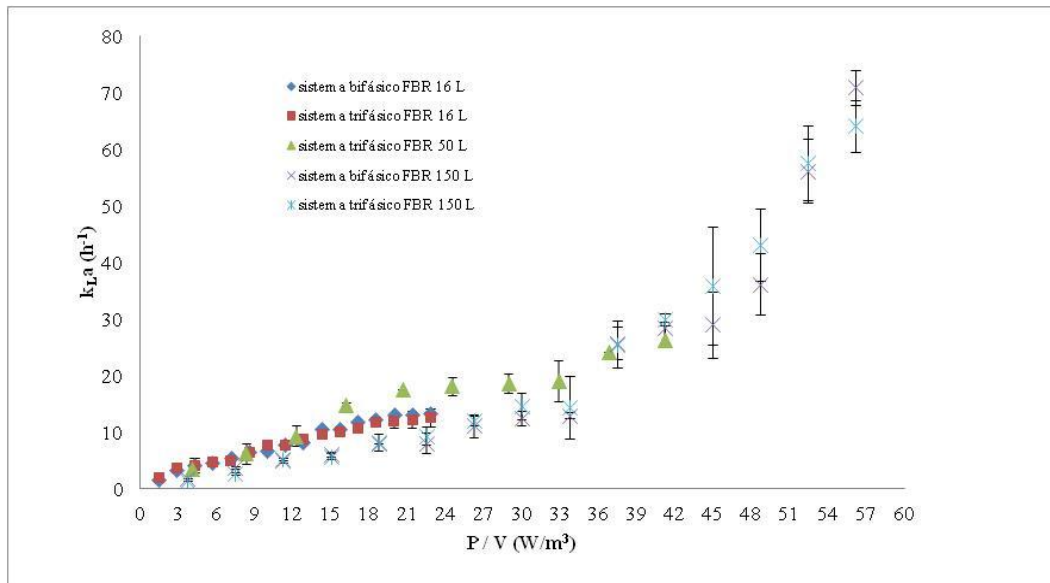


Figura 14. P/V vs k_{La} en los FBR de 16, 50 y 150 L en un sistema bifásico y trifásico

Una vez conocida la hidrodinamia y la transferencia de masa de los FBR de 16 y 150 L, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de cultivo para aumentar la productividad y fijación de nitrógeno del CM. Para ello, se utilizó como variable el flujo de aire suministrado al fotobiorreactor y se observó que la cantidad de aire alimentado mejoró la distribución de los nutrientes en el medio de cultivo, evitando la sedimentación del mismo, sin afectar el coeficiente de transferencia de masa, el cual indica la cantidad de CO_2 y oxígeno disponible para los microorganismos que conforman el CM. Así mismo, favoreció la frecuencia luz/oscuridad que incide en la productividad así como la eficiencia fotosintética (Grobbelar, 2000). Un suministro elevado de aire a un FBR puede dar como resultado una baja eficiencia de utilización de CO_2 , e indicar que el proceso es poco eficiente y costoso para la producción comercial a gran escala; por lo que

fue necesario optimizar las condiciones de aireación con la finalidad de mejorar la productividad de biomasa y la eficiencia de utilización de CO₂ (Zhang *et al.*, 2002a). Con base en lo anterior se llevó a cabo la evaluación del desempeño biológico del CM en cada uno de los flujos de aire seleccionados.

8.5 ETAPA 5. Optimización de las condiciones de cultivo del CM en un FBR de 150 L bajo condiciones controladas

La primera variable que se optimizó en el FBR de 150 L fue el volumen de inóculo necesario para iniciar los cultivos por lote, y provino de la biomasa final obtenida en el FBR de 50 L. Los volúmenes de inóculo utilizados fueron 18 L (12 %), 36 L (24 %) y 50 L (33 %). En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en cada cultivo por lote a diferentes porcentajes de inóculo.

En la Tabla 14 se observa que la productividad de biomasa aumentó conforme se incrementó el porcentaje de inóculo utilizado para llevar a cabo la producción en lote. Cada cultivo por lote tuvo una duración de 14 días, obteniendo al día 14 en todos los casos el valor máximo de biomasa igual a 53, 90 y 124 mg L⁻¹ correspondientes a cada porcentaje de inóculo estudiado 12, 24 y 33 % respectivamente. Los resultados obtenidos indican que el aumento de la producción de biomasa estuvo directamente relacionado con el volumen de inóculo utilizado; debido probablemente a una mejor adaptación de los organismos a las condiciones de operación del FBR, lo que se vió reflejado en la productividad de biomasa obtenida al final de cada uno de los cultivos por lote.

El incremento del contenido de clorofila *a* durante el cultivo por lote indica la predominancia de los organismos fotosintéticos presentes en el CM. En la Tabla 14 se observa un incremento del contenido de clorofila *a* conforme aumenta el porcentaje de inóculo, obteniendo la concentración más elevada de clorofila *a* en

el cultivo por lote donde se utilizó un 33 % de inóculo, alcanzando una concentración de 1.8 mg L^{-1} al día 14.

El consumo específico de fosfatos se vió afectado por la concentración de biomasa obtenida al final de los cultivos por lote y fue en el tercer cultivo (33 % inóculo) donde se presentó el mayor consumo con un valor de $0.0022 \text{ mg mg}^{-1}$ peso seco h^{-1} y la mayor productividad, obteniéndose una concentración residual de fosfato de 13 mg L^{-1} al día 14, por lo que no llega a ser un nutriente limitante para el crecimiento del CM (Tabla 14).

En la Tabla 14 se observa que no existió una variación significativa del pH en los cultivos por lote, cuyos valores oscilaron entre 7.3 y 7.9 mismos que no afectaron el desempeño biológico del CM.

Conocer la variación de la concentración de nitratos y amonio en los cultivos por lote fue importante porque concentraciones elevadas de estos compuestos pueden inhibir el funcionamiento del complejo enzimático nitrogenasa, encargado de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno. En la Tabla 14 se presenta la variación de la concentración de NO_3^- y NH_4^+ en el FBR de 150 L a los diferentes porcentajes de inóculo. Los valores más altos fueron 0.39, 0.45 y 0.14 mg L^{-1} de nitratos, y 1.6, 1.3 y 1.3 mg L^{-1} de NH_4^+ para cada cultivo por lote respectivamente, los cuales son inferiores a las concentraciones reportadas en literatura como inhibitorias del funcionamiento del complejo enzimático nitrogenasa (1240 mg L^{-1} de NO_3^- y 18 mg L^{-1} de NH_4^+) (Almon y Boger, 1988; Li *et al.*, 2010). De lo anterior se consideró que el funcionamiento de la enzima no se vio afectado por la presencia de estos compuestos en el cultivo.

La variación de la actividad volumétrica de nitrogenasa se presenta en la Tabla 14, observándose una pequeña variación entre los cultivos por lote, lo que indica

probablemente la adaptación del CM a las condiciones de operación dentro del FBR. El máximo valor de actividad específica de nitrogenasa se obtuvo a los días 14, 3 y 8 en los diferentes cultivos por lote y fueron de 373451, 213128 y 85506 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹ respectivamente. El valor de actividad específica de nitrogenasa disminuyó conforme se incrementó la concentración de biomasa en los cultivos al aumentar el volumen de inóculo. Estos valores fueron de 1 a 5 veces superiores a lo reportado por Reyna-Velarde (2010) y Hernández (2009) (93380 nmoles eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹ y 75211 nmoles eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹) quienes trabajaron con el CM en un FBR de 50 L.

Tabla 14. Resultados globales del desempeño biológico del CM en el FBR de 150 L con diferentes tasas de dilución

% inóculo	Productividad (mg/L h)	Variación de Clorofila a (mg/L)	Consumo PO ₄ ⁻³ (mg/mg peso seco h)	Variación NH ₄ ⁺ (mg/L)	Variación NO ₃ ⁻ (mg/L)	pH	Actividad de nitrogenasa (nmol eteno/L h)
12	0.06	0.2-0.5	0.0009	0.3-1.6	0.27-0.39	7.4-7.8	4444-19916
24	0.16	0.5-1.5	0.0013	0.1-1.3	0.007-0.45	7.3-7.9	1458-15629
33	0.35	0.4-1.8	0.0022	0.3-1.3	0.14	7.3-7.8	2720-10292

De acuerdo a los resultados anteriores, el mejor porcentaje de inóculo para llevar a cabo la propagación del CM en el FBR de 150 L bajo condiciones controladas es del 33.33 %.

Una vez seleccionado el porcentaje de inóculo a utilizar, se procedió a optimizar la segunda variable correspondiente a la variación del flujo de aire suministrado al FBR en cultivo por lote y se estudiaron los valores de 60, 70, 80, 90 y 100 L min⁻¹. En la Tabla 15 se muestran los resultados globales en cada lote experimental y en la figura 15 se presenta la variación de biomasa en peso seco para cada lote con los diferentes flujos de aire seleccionados. El cultivo por lote operando con un flujo

de aire de 60 L min^{-1} inició con una concentración de biomasa en base seca de 55 mg L^{-1} , alcanzando el valor máximo de biomasa al día 14 de 180 mg L^{-1} , una productividad de $0.34 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una velocidad específica de crecimiento de 0.065 d^{-1} . El cultivo por lote operando con un flujo de aire de 70 L min^{-1} inició con una concentración de biomasa en base seca de 23 mg L^{-1} alcanzando al día 8 el máximo de biomasa con 87 mg L^{-1} ; este valor correspondió al término de la fase exponencial hasta donde se obtuvo una productividad de $0.24 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una velocidad específica de crecimiento de 0.046 d^{-1} . El cultivo por lote operando con un flujo de aire de 80 L min^{-1} inició con una concentración de biomasa en base seca de 53 mg L^{-1} obteniendo la concentración máxima de biomasa al día 14 igual a 155 mg L^{-1} con una productividad de $0.30 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. En la misma figura 15 podemos observar un crecimiento ascendente y constante a partir del segundo día y hasta el final del cultivo con una velocidad específica de crecimiento de 0.048 d^{-1} . El cultivo por lote operando con un flujo de aire de 90 L min^{-1} inició con una concentración de biomasa en base seca de 22 mg L^{-1} alcanzando al día 12 el valor máximo de biomasa con 125 mg L^{-1} . La productividad obtenida al final de la fase exponencial fue de $0.35 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y la velocidad específica de crecimiento fue de 0.074 d^{-1} . El cultivo por lote operando con un flujo de aire de 100 L min^{-1} no mostró resultados favorables debido a que inició con una concentración de biomasa de 42 mg L^{-1} y finalizó al quinto día de cultivo con una concentración de 58 mg L^{-1} ; lo anterior debido a que a partir del tercer día como se observa en la figura 15, disminuyó la concentración de biomasa del CM, y se presentó una coloración amarilla y adherencia de la biomasa a las paredes del FBR lo que hace suponer que se presentó la muerte celular del cultivo misma que se corroboró con observaciones al microscopio óptico de filamentos rotos debido probablemente al

estrés hidrodinámico generado dentro del fotobiorreactor al operarse con flujos elevados.

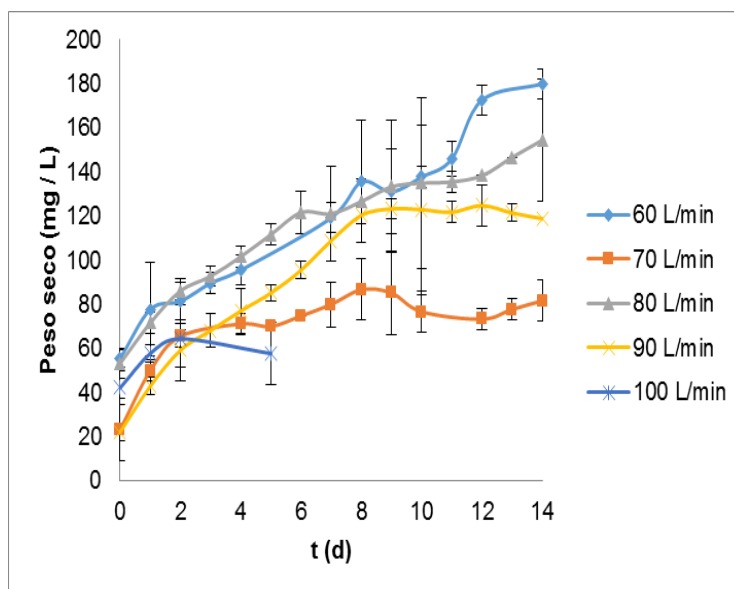


Figura 15. Crecimiento del CM en un FBR de 150 L tipo air-lift de cara plana con diferentes flujos de aire (n=3)

La variación del contenido de clorofila *a* se muestra en la Tabla 15, donde es posible observar que los valores máximos se obtuvieron al final de la fase exponencial y correspondieron a 2.4, 0.7, 3.2, 1.8 y 0.3 mg L⁻¹ en cada cultivo por lote respectivamente. Además de que el mayor incremento de clorofila *a* se obtuvo en los lotes operando con flujos de aire de 60 y 80 L min⁻¹.

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 15, el PO₄⁻³ no resultó un nutriente limitante para el desarrollo del CM, debido a que la concentración al final de los lotes experimentales fue de 6, 15, 10, 13 y 19 mg L⁻¹ correspondientes a los flujos de aire de 60, 70, 80, 90 y 100 L min⁻¹ respectivamente. Lo anterior representa un consumo específico de PO₄⁻³ de aproximadamente 0.0004, 0.0022, 0.0009, 0.0022 y 0.001 mg/mg peso seco h, el cual varió dependiendo de la concentración de biomasa obtenida al final de cada cultivo por lote.

En la Tabla 15 se muestran los valores de pH registrados a lo largo de los cultivos por lote, los cuales oscilaron entre 7.2 y 8.5, notándose el mayor incremento en el lote operado con un flujo de aire de 60 L min^{-1} . En general los valores de pH registrados se encuentran dentro del rango óptimo para el crecimiento de cada uno de los microorganismos que conforman el CM (Tabla 12).

Adicionalmente, se estudió la variación de la concentración de NO_3^- y NH_4^+ en los cultivos por lote, ya que estos dos compuestos en concentraciones elevadas de 20 mM (1240 mg L^{-1}) y 1 mM (18 mg L^{-1}) (Almos y Boger, 1988; Li *et al.*, 2010) respectivamente, pueden inhibir el funcionamiento del complejo enzimático nitrogenasa encargado de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno. En la Tabla 15 se muestra el intervalo de variación de NO_3^- y NH_4^+ mostrando las concentraciones más elevadas del primero en los cultivos por lote con flujos de aire de 60 y 70 L min^{-1} cuyos valores fueron de 1.6 y 0.45 mg L^{-1} respectivamente y para el amonio en los cultivos por lote con flujos de aire de 60 y 100 L min^{-1} , los valores fueron de 6.3 y 3.7 mg L^{-1} respectivamente, mismos que no llegar a inhibir el funcionamiento de la enzima nitrogenasa de acuerdo a lo mencionado anteriormente.

La variación de la actividad volumétrica de nitrogenasa se presenta en la Tabla 15, donde se observa una variación entre los cultivos por lote, lo que probablemente indica la adaptación y dinámica de poblaciones de los microorganismos que conforman el CM bajo las distintas condiciones de operación dentro del FBR. También se observó un aumento de la actividad de nitrogenasa conforme se incrementó el flujo de aire suministrado al FBR, con los mayores valores a un flujo de aire de 80 L min^{-1} . Los máximos valores de actividad específica de nitrogenasa se obtuvieron a los días 3, 13, 2, y 8 en los

cultivos por lote con flujos de aire de 60 , 70, 80 y 90 L min⁻¹, y fueron iguales a 46339, 138943, 153851 y 85506 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹ respectivamente; observándose un aumento del valor de actividad específica conforme se incrementó el flujo de aire. Los valores mencionados resultan superiores aproximadamente 5 a 60 veces a lo reportado por Prabakaran *et al.* (2010) para *Leptolyngbya valderiana* BDU20041 (9000 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹) y por Kannaiyan, (2002b) para *Nostoc muscorum* DOH (2237 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹).

Tabla 15. Resultados globales del desempeño biológico del CM en el FBR de 150 L a diferentes flujos de aire

Flujo de aire (L min ⁻¹)	Productividad (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	Variación de Clorofila a (mg L ⁻¹)	Consumo PO ₄ ⁻³ (mg mg ⁻¹ peso seco h ⁻¹)	Variación NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	Variación NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	pH	Actividad de nitrogenasa (nmol eteno L ⁻¹ h ⁻¹)
60	0.34	0.065	0.9-2.4	0.0004	0.1-6.3	0-1.6	8.0-8.5	93-4153
70	0.24	0.046	0.5-0.7	0.0022	0.7-1.6	0.007-0.45	7.2-7.4	3992-10806
80	0.30	0.048	0.4-3.2	0.0009	0-2.1	0.01-0.07	7.4-7.7	2547-13248
90	0.35	0.074	0.3-1.8	0.0022	0.3-1.3	0.14	7.3-7.8	2720-10292
100	-----	-----	0.6-0.3	0.001	0.007-3.7	0.02-0.11	7.4-7.5	2146-1093

De acuerdo a los resultados mencionados anteriormente, se seleccionó el flujo de aire de 80 L min⁻¹ ya que presenta el mayor valor de actividad específica de nitrogenasa, una alta productividad de biomasa y la concentración más elevada de clorofila a.

Una vez optimizadas las condiciones de cultivo del CM en el FBR de 150 L, se establecieron las condiciones de operación del FBR de 16 L, el cual fue diseñado para incrementar la producción de inóculo a utilizarse en los experimentos en el

FBR de 50 L además de validar el criterio de escalamiento utilizado para el FBR de 150 L.

A partir de la caracterización hidrodinámica y de transferencia de masa del FBR de 16 L reportada en el apartado 8.4, se realizaron dos cinéticas de producción del CM en cultivo por lote durante 14 días cada una, utilizando los flujos de aire de 10 y 12 L min⁻¹, y un porcentaje de inóculo del 33 % proveniente del fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 11 L. En la figura 16 y Tabla 16 se muestran los resultados del desempeño biológico del CM en el FBR de 16 L.

El primer cultivo por lote trabajando con un flujo de aire de 10 L min⁻¹ inició con una concentración de biomasa en base seca de 226 mg L⁻¹ alcanzando al día 4 el máximo de biomasa con 323 mg L⁻¹; una productividad de 1 mg L⁻¹ h⁻¹ con una velocidad específica de crecimiento de 0.092 d⁻¹, estos valores corresponden al final de la fase exponencial. En la figura 16 A después de éste punto se observa la fase de muerte celular. En el segundo cultivo por lote operando con un flujo de aire de 12 L min⁻¹, la concentración inicial de biomasa en base seca fue de 163 mg L⁻¹, y su valor máximo al día 7 fue de 232 mg L⁻¹; la productividad al final de la fase exponencial fue de 0.41 mg L⁻¹ h⁻¹ con una velocidad específica de crecimiento de 0.055 d⁻¹ (Fig. 16 A).

En la figura 16 B se observa que la concentración de clorofila *a* aumenta conforme al tiempo obteniendo su valor más alto en el primer cultivo por lote al día 4 con 5.13 mg L⁻¹; pasado este tiempo, el contenido de clorofila *a* disminuyó lo que coincide con la cinética de producción de biomasa mostrada en la figura 16 A; en el segundo cultivo por lote al día 13 se alcanzó el valor máximo de clorofila *a* que fue de 4.46 mg L⁻¹, lo que indica un aumento de organismos fotosintéticos a lo largo del cultivo por lote.

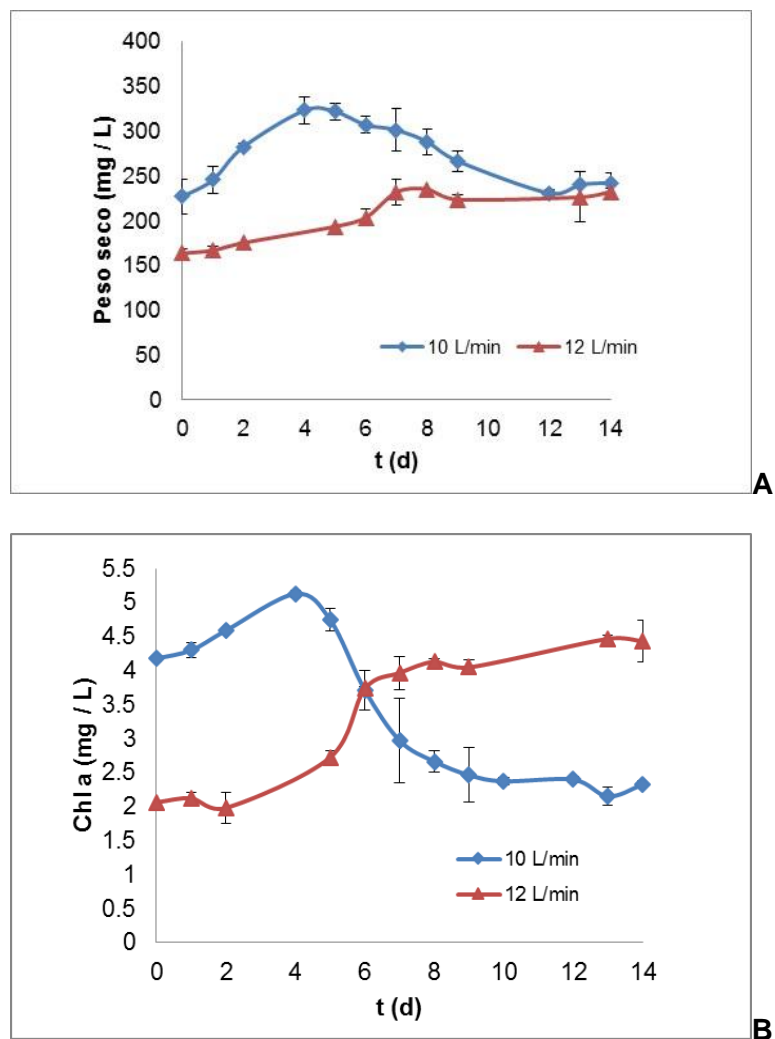


Figura 16. Crecimiento (A) y contenido de Clorofila a (B) vs tiempo en el FBR de 16 L (n=3)

En la Tabla 16 se presenta el consumo específico de fosfato de $0.00015 \text{ mg mg}^{-1}$ peso seco h^{-1} para el primer cultivo por lote, alcanzando al final del cultivo una concentración de 10 mg L^{-1} . En el segundo cultivo por lote el consumo específico de fosfato fue de $0.00016 \text{ mg mg}^{-1}$ peso seco h^{-1} y al día 14 la concentración final de fosfato fue de 13 mg L^{-1} , lo que prueba que este nutriente no llegó a ser limitante para el funcionamiento del CM.

En la Tabla 16 se presentan los valores de pH registrados a lo largo del cultivo por lote, los cuales oscilaron entre 6.8 y 7.7; los valores de pH más bajos se obtuvieron en el primer lote cuando la concentración de biomasa alcanzó su valor

máximo. Pasado este punto el pH aumentó de 7 a 7.4 aproximadamente, manteniéndose así hasta el final del experimento. En el segundo lote el pH se mantuvo entre 7.4 y 7.7 a lo largo de la cinética, lo que favoreció el crecimiento del CM por más tiempo, aunque no se llegó a obtener la misma productividad de biomasa del primer cultivo por lote.

En la Tabla 16 se muestra el intervalo de concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ en los cultivos por lote, y se observa que las concentraciones más altas se presentaron los días 0 y 4 para el primer cultivo por lote con valores de 0.45 mg L^{-1} de nitratos y 2.1 mg L^{-1} de amonio respectivamente, y a los días 0 y 9 para el segundo cultivo por lote con 0.13 mg L^{-1} de nitratos y 2.1 mg L^{-1} de amonio, los cuales no son superiores a lo reportado en literatura, por lo que el complejo enzimático aparentemente no se vió afectado por la presencia de estos dos elementos en el CM.

En la Tabla 16 se presentan los valores de actividad volumétrica de nitrogenasa y se aprecia que el mayor fue para el primer cultivo por lote con $32792 \text{ nmol eteno L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ el cual corresponde a una actividad específica de nitrogenasa de $106933 \text{ nmol eteno g}^{-1} \text{ peso seco h}^{-1}$. En el segundo cultivo por lote la actividad específica de nitrogenasa fue de $33987 \text{ nmol eteno/g peso seco h}$. Estos valores de actividad específica de nitrogenasa fueron aproximadamente de 3 a 29 veces superiores a lo reportado por Prabakaran *et al.* (2010) para *Leptolyngbya valderiana* BDU20041 ($9000 \text{ nmol eteno g}^{-1} \text{ peso seco h}^{-1}$) y Kannaiyan *et al.* (1997) para *Anabaena azollae* SK6 ($3571 \text{ nmol eteno g}^{-1} \text{ peso seco h}^{-1}$).

Tabla 16. Resultados globales del desempeño biológico del CM en el FBR de 16 L a diferentes flujos de aire

Flujo de aire (L min ⁻¹)	Productividad (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	Consumo PO ₄ ³⁻ (mg mg ⁻¹ peso seco h ⁻¹)	Variación NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	Variación NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	pH	Actividad de nitrogenasa (nmol eteno L ⁻¹ h ⁻¹)
10	1.0	0.092	0.00015	0.9-2.1	0.05-0.45	6.8-7.5	5431-32792
12	0.41	0.055	0.00016	1.4-2.1	0.017-0.13	7.4-7.7	512-7590

De acuerdo a los resultados mostrados previamente, se seleccionó el flujo de aire de 10 L min⁻¹ para operar el FBR de 16 L en condiciones controladas, tomando como base la productividad y fijación de nitrógeno mostrada por el CM a lo largo de las cinéticas del cultivo por lote.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas para la producción del CM en los FBR de 16 y 150 L en condiciones controladas de luz y temperatura, se llevó a cabo la propagación del consorcio en los fotobiorreactores tipo *air-lift* de cara plana de 16, 50 y 150 L cuya geometría es semejante. La operación fue secuencial, utilizando como inóculo la biomasa obtenida al final de cada uno de los cultivos por lote (Fig. 17).

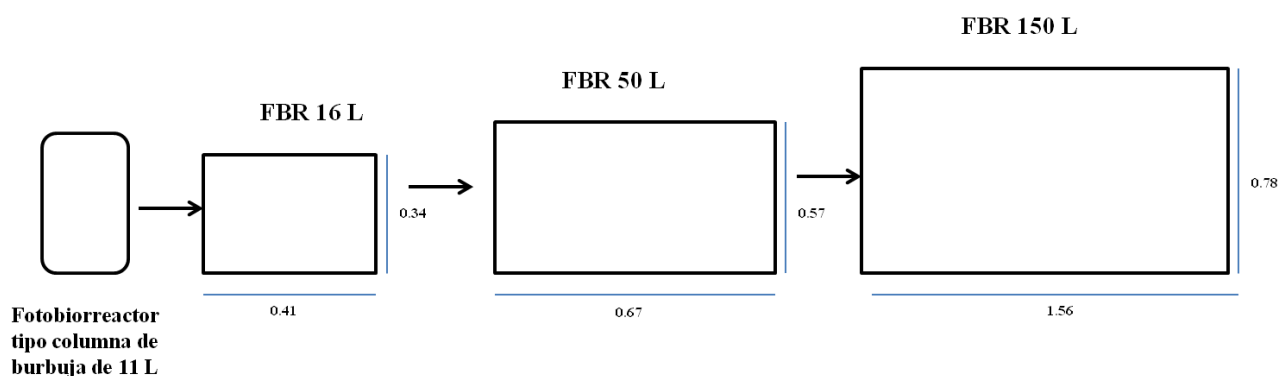


Figura 17. Esquema conceptual del escalamiento para la producción del consorcio microbiano fotosintético en los fotobiorreactores

En la figura 18 y Tabla 17 se muestran los resultados globales del desempeño biológico del CM en los tres FBR utilizados.

El cultivo por lote en el FBR de 16 L inició con una concentración de biomasa en base seca de 240 mg L^{-1} , alcanzando al día 3 el valor máximo de biomasa con 260 mg L^{-1} (Fig. 18), posterior a este punto se observa una fase de muerte celular, por lo que se decidió detener el cultivo por lote al día 4, con la finalidad de que la biomasa se encontrara en condiciones óptimas para ser utilizada como inóculo para el siguiente FBR de mayor volumen. La productividad obtenida al final de la fase exponencial del cultivo por lote fue de $0.27 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y la velocidad específica de crecimiento de 0.037 d^{-1} (Tabla 17). El FBR de 50 L inició con una concentración de biomasa en base seca de 71 mg L^{-1} , presentando una variación del 10 % de la concentración de biomasa a través del tiempo a partir del día 5, con un valor máximo de biomasa al día 14 igual a 148 mg L^{-1} (Fig. 18). La productividad obtenida al final del cultivo por lote fue de $0.23 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una velocidad específica de crecimiento de 0.113 d^{-1} al término de la fase exponencial (Tabla 17). El cultivo por lote en el FBR de 150 L inició con una concentración de biomasa en base seca de 53 mg L^{-1} , y se observó un incremento constante del contenido de biomasa en base seca a través del tiempo, que al día 12 alcanzó su valor máximo de 113 mg L^{-1} (Fig. 18), con una productividad de $0.21 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una velocidad específica de crecimiento de 0.090 d^{-1} . En los tres fotobiorreactores se observó una productividad similar con velocidades específicas de crecimiento que aumentaban conforme se incrementaba el volumen del FBR a operar, siendo semejante en los FBR de 50 y 150 L, lo que probablemente indica una adaptación del CM a las condiciones de operación de los tres FBR, además de que la concentración de inóculo utilizado para el crecimiento del CM en cada uno de los

FBR fue la adecuada y se encontraba en óptimas condiciones para su propagación en un volumen mayor. Los datos anteriores indican que la estrategia de producción del CM a gran escala utilizando reactores de geometría semejante resultó adecuada para este proceso.

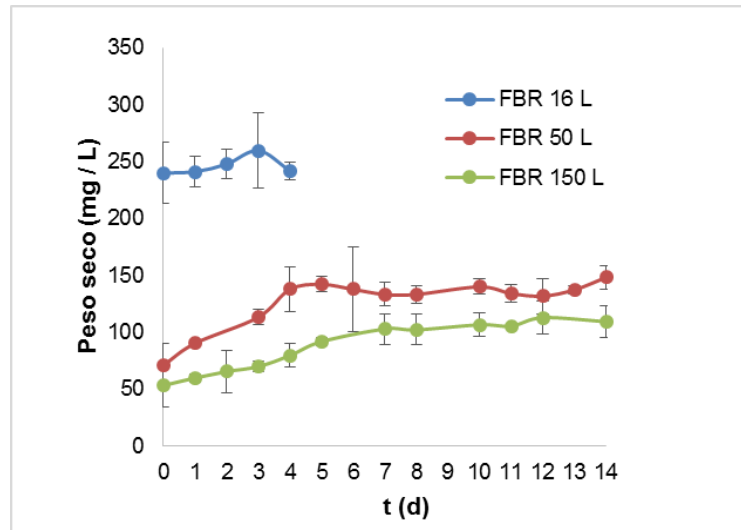


Figura 18. Crecimiento vs tiempo en los tres FBR en condiciones controladas (n=3)

En la Tabla 17 se muestra la variación del contenido de clorofila *a* en los tres FBR, los valores máximos registrados se obtuvieron al final de los cultivos por lote; el valor máximo de clorofila *a* se obtuvo en el FBR de 16 L con 4.6 mg L^{-1} al día 4, en los FBR de mayor volumen el contenido de clorofila disminuyó conforme se aumentó el volumen de operación, lo que nos indica una adaptación de los organismos fotosintéticos a las condiciones hidrodinámicas y de transferencia de masa de cada FBR.

El consumo específico de fosfatos en los tres FBR se muestra en la Tabla 17, donde se aprecia un incremento de su valor al aumentar la velocidad específica de crecimiento, así como el tiempo de operación de los mismos. El contenido de fosfatos al final de cada cultivo por lote fue de 17, 13 y 15 mg L^{-1} en los FBR de

16, 50 y 150 L respectivamente, por lo que tampoco este nutriente llegó a ser limitante para el crecimiento del CM.

El pH osciló entre 7 y 8.5 en los tres FBR (Tabla 17), estos valores se encuentran dentro del rango de pH óptimo para el crecimiento de cada uno de los microorganismos que conforman el CM (Tabla 12).

Debido a que el NO_3^- y el NH_4^+ en concentraciones elevadas pueden inhibir el funcionamiento del complejo enzimático nitrogenasa (Almon y Boger, 1988; Li *et al.*, 2010), se evaluó la variación de su concentración respecto al tiempo. En la Tabla 17 se muestran los resultados de estos ensayos en cada cultivo por lote y se aprecia que la concentración de NH_4^+ más elevada se obtuvo en el FBR de 150 L y fue de 1.86 mg L^{-1} y de NO_3^- en el FBR de 50 L con 0.42 mg L^{-1} . Ambos valores resultan inferiores a los reportados en la literatura como inhibidores, por lo que el complejo enzimático no fue afectado por la presencia de estos dos compuestos.

El valor de actividad volumétrica de nitrogenasa se muestra en la Tabla 17 donde se observa un incremento de aproximadamente 10 % al aumenta el volumen del FBR de 50 a 150 L; los máximos valores específicos de actividad de nitrogenasa se obtuvieron al día 3, 14 y 7 con 32231, 50612 y 96824 nmol eteno g^{-1} peso seco h^{-1} en el FBR de 16, 50 y 150 L respectivamente. Dichos valores son superiores aproximadamente de 3 a 27 veces a lo reportado en literatura para *Leptolyngbya valderiana* BDU20041 ($9000 \text{ nmol eteno g}^{-1}$ peso seco h^{-1}) (Prabaharan *et al.*, 2010) y *Anabaena azollae* SK6 ($3571 \text{ nmol eteno g}^{-1}$ peso seco h^{-1}) (Kannaiyan *et al.*, 1997).

Tabla 17. Resultados globales del desempeño biológico del CM en los tres FBR bajo condiciones controladas

FBR	Productividad (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	Variación de Clorofila a (mg L ⁻¹)	Consumo PO ₄ ⁻³ (mg mg ⁻¹ peso seco h ⁻¹)	Variación NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	Variación NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	pH	Actividad de nitrogenasa (nmol eteno L ⁻¹ h ⁻¹)
16 L	0.27	0.037	3.8-4.6	0.0002	0.3-1.03	0.07-0.22	7.4-7.7	5919-8369
50 L	0.23	0.113	0.9-2.4	0.0005	0-0.91	0-0.42	7.0-7.9	1419-7507
150 L	0.21	0.090	0.5-1.5	0.0006	0.14-1.86	0.02-0.17	7.8-8.5	2175-9969

Una vez optimizadas las condiciones de cultivo en los tres fotobiorreactores bajo condiciones controladas de luz y temperatura, se llevó a cabo el diseño del bioproceso para la producción del CM a la intemperie.

8.6 ETAPA 6. Diseño del bioproceso para la producción del biofertilizante a escala semi piloto

En la figura 19 se muestra el esquema general del bioproceso, donde se incluyen los tres FBR (16, 50 y 150 L), así como el compresor de aire, el tanque para la preparación del medio de cultivo y el tanque de almacenamiento para la biomasa cosechada.

En el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería se construyó un área denominada Unidad Experimental de Cultivo de Algas (UECA) donde se colocaron los tres FBR (16, 50 y 150 L) para la producción del CM a la intemperie, los cuales están conectados al compresor de aire del departamento. Para regular el flujo de aire suministrado a cada uno de los FBR se colocaron válvulas reguladoras de presión, así como rotámetros en la entrada de aire de cada FBR. En las figuras 20 y 21 se muestran imágenes de la UECA.

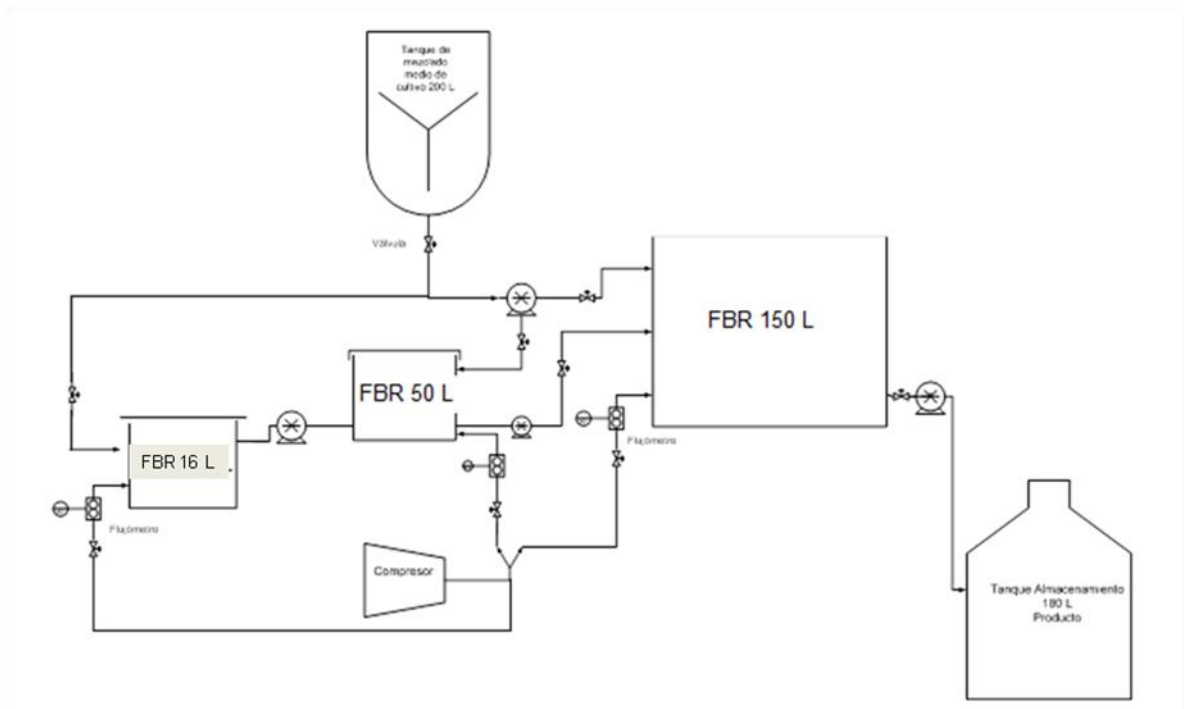


Figura 19. Esquema general del bioproceso



Figura 20. Área semi piloto para la producción del CM (vista lateral)



Figura 21. Área semi piloto para la producción del CM (vista frontal)

Construida y equipada la UECA, se llevó a cabo la producción a la intemperie en lote y lote secuencial del CM en el periodo marzo-mayo de 2013.

8.7 ETAPA 7. Producción del CM por lote y lote secuencial en un FBR de 150 L a la intemperie

8.7.1 Producción en cultivo por lote (FBR 16 L)

La producción y evaluación del desempeño biológico del CM se llevó a cabo en el FBR de 16 L a la intemperie por 14 días, la temperatura promedio registrada en el interior del FBR fue de 23 ± 8 °C (mínima 11 °C, máxima 34 °C) y la temperatura ambiente de 24 ± 6 °C (mínima 12 °C, máxima 34 °C); la intensidad lumínica promedio durante el experimento en cultivo por lote fue de $281 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un mínimo de $29 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un máximo de $1080 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En la Tabla 18 se muestran los resultados globales del desempeño biológico del CM.

La concentración inicial de biomasa en base seca fue de 113 mg L^{-1} , el cultivo presentó una fase de adaptación a las condiciones ambientales de temperatura e intensidad de luz de aproximadamente 7 días, pasado ese tiempo, inició la fase exponencial de crecimiento que se mantuvo hasta el día 14 en la cual el valor máximo de biomasa fue de 275 mg L^{-1} , con una productividad de $0.48 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una velocidad específica de crecimiento al final de la fase exponencial de 0.44 d^{-1} . La concentración de clorofila *a* durante el experimento presentó un comportamiento similar al crecimiento obteniendo su valor máximo al día 14 con 2.21 mg L^{-1} (Tabla 18).

El consumo específico de fosfato fue de $0.0003 \text{ mg mg}^{-1} \text{ peso seco h}^{-1}$, la concentración inicial de este elemento fue de 14.6 mg L^{-1} y la concentración remanente al final del cultivo fue de 7.5 mg L^{-1} , con un porcentaje de consumo de

aproximadamente el 48 %, lo que indica que este nutriente no llegó a ser limitante para el crecimiento del CM (Tabla 18).

En la misma Tabla 18 se presenta el comportamiento del pH durante el cultivo por lote, y se observa que osciló en el intervalo de 7.3-8.8. En este intervalo se encuentran los valores óptimos para el crecimiento de cada uno de los microorganismos que conforman el CM (Tabla 12).

En la Tabla 18 se presenta la variación de la concentración de NO_3^- y NH_4^+ a lo largo del cultivo por lote, los valores más altos registrados fueron 31 mg L^{-1} de NH_4^+ y 1 mg L^{-1} de NO_3^- a los días 7 y 11 respectivamente. El valor de amonio presentado al día 7 es superior a lo reportado en literatura por Almon y Boger (1988) y Li *et al.* (2010), lo que puede causar una inhibición del funcionamiento del complejo enzimático nitrogenasa. A partir del día 8 y hasta el final del lote la concentración de amonio disminuyó hasta alcanzar un valor de 1.06 mg L^{-1} . La regulación del contenido de NO_3^- y NH_4^+ en el cultivo, se lleva a cabo probablemente mediante la asimilación de estos elementos por las bacterias que conforman al consorcio, tales como *Methylibium petroleiphilum* y *Aquaspirillum delicatum*.

La variación de la actividad de nitrogenasa a lo largo del cultivo por lote se muestra en la Tabla 18, donde se observa que el valor más bajo igual a $45 \text{ nmol eteno L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ se presentó cuando la concentración de amonio aumentó significativamente en los días 6, 7 y 8. El máximo valor de actividad de nitrogenasa se registró al día 14 de cultivo con $2277 \text{ nmol eteno L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ el cual corresponde a un valor específico de $8988 \text{ nmol eteno g}^{-1} \text{ peso seco h}^{-1}$.

Tabla 18. Resultados globales del desempeño biológico del CM en el FBR de 16 L a la intemperie

Productividad (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	Variación de Clorofila a (mg L ⁻¹)	Consumo PO ₄ ⁻³ (mg mg ⁻¹ peso seco h ⁻¹)	Variación NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	Variación NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	pH	Actividad de nitrogenasa (nmol eteno L ⁻¹ h ⁻¹)
0.48	0.44	0.35-2.21	0.0003	0.19-31	0.24-1	7.3-8.8	45-2277

Para tratar de reducir el tiempo de adaptación del CM en el FBR de 16 L, se colocó un inóculo a la intemperie por 28 días, con un flujo de aire de 1vvm en un fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 10 L, en el cual se emplearon 3 L de cultivo como inóculo, provenientes de un fotobiorreactor del mismo diseño pero de 11 L operando en condiciones controladas y 7 L de medio mineral BG-11₀ sin esterilizar; se realizaron dos resiembras del cultivo por lote, determinando así el tiempo de residencia hidráulico del cultivo igual a 14 días. La productividad obtenida en el segundo cultivo por lote después de 28 días de operación del fotobiorreactor fue de 0.86 mg L⁻¹ h⁻¹ con un valor de actividad de nitrogenasa igual a 3280 nmol eteno L⁻¹ h⁻¹ (10061 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹).

La figura 22 muestra una imagen del fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 10 L colocado a la intemperie, y la figura 23 imágenes del CM después de la segunda resiembra, a los 28 días de operación del mismo fotobiorreactor. En la figura 23 (a) se puede observar una gran cantidad de cianobacterias filamentosas agrupadas en la matriz de exopolisacárido producida por este consorcio, las cuales forman microagregados celulares, y en la figura 23 (b) se muestran filamentos suspendidos en el medio de cultivo que tenían de 4 a 6 heterocistos cada uno.



Figura 22. Fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 10 L de capacidad a la intemperie (día 28)

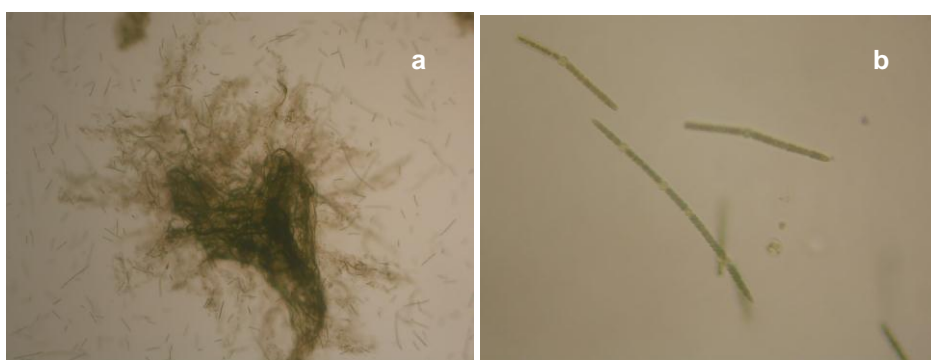


Figura 23. CM creciendo en el fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 10 L a la intemperie (día 28) (40 X)

Una vez adaptado el inóculo a la intemperie se procedió a la producción del CM en los tres fotobiorreactores tipo *air-lift* de cara plana de 16, 50 y 150 L de capacidad y se realizó un escalamiento secuencial por lote. La biomasa obtenida al final de cada cultivo se utilizó como inóculo del siguiente FBR con mayor volumen de operación (Fig. 17) y se evaluó el desempeño biológico del cultivo en cada FBR.

8.7.2 Producción en cultivo por lote (FBR 16, 50 y 150 L)

En la Tabla 19 y figuras 24 y 25 se presentan los resultados globales del desempeño biológico del CM obtenidos en los tres FBR operando en cultivo por lote.

La concentración inicial de biomasa en base seca del cultivo en el FBR de 16 L fue de 131 mg L^{-1} . Al día 10 se alcanzó el valor máximo de biomasa que fue igual a 374 mg L^{-1} (Fig. 24), la productividad obtenida al final del cultivo fue de $1.01 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y la velocidad específica de crecimiento al término de la fase exponencial fue de 0.005 h^{-1} (0.12 d^{-1}).

Se detectó un perfil similar de producción de biomasa del CM en base seca durante el cultivo por lote en los FBR de 50 y 150 L (Fig. 24). La fase de adaptación fue de aproximadamente 7 días y posteriormente inició la fase exponencial de crecimiento hasta alcanzar la concentración máxima de biomasa al día 14 de cultivo (385 y 600 mg L^{-1} para el FBR de 50 y 150 L respectivamente), lo que probablemente indica la adaptación del cultivo a las condiciones hidrodinámicas previamente determinadas (tiempo de mezclado, gas “hold-up”, etc.) dentro de los FBR, así como a la distribución de nutrientes y de luz. Asimismo, los resultados anteriores indican que al conservar la configuración geométrica de los FBR es factible escalar el proceso a un mayor volumen sin afectar la producción de biomasa, resultado que se refleja en el aumento de la productividad de biomasa observado (0.77 y $1.19 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para el FBR de 50 y 150 L respectivamente), conforme se aumentó la capacidad del FBR, sin verse afectado por las condiciones ambientales presentadas a la intemperie (luz y temperatura). Las velocidades específicas de crecimiento presentadas en cada uno de los FBR fueron 0.005 y 0.007 h^{-1} para el de 50 y 150 L respectivamente.

La temperatura promedio registrada en el interior de los FBR de 50 y 150 L operando en lote, fue de $24 \pm 5^\circ\text{C}$ y $23 \pm 4^\circ\text{C}$ respectivamente, y el promedio de luz incidente en cada FBR fue de 214 y $210 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivamente. La productividad de biomasa en los tres FBR resultó similar, lo que

probablemente indica una adaptación del CM a las condiciones de operación de los FBR así como a las condiciones ambientales de luz y temperatura registradas en este periodo de cultivo

La adaptación de cultivos de microalgas para su producción en fotobiorreactores a la intemperie ha sido previamente reportada por Li *et al.* 2015, quienes llevaron a cabo la producción de *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella sorokiniana* en un fotobiorreactor de cara plana de 48 L. También Slegers *et al.* (2011) estudiaron la producción de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira pseudonana* en fotobiorreactores de cara plana de diferente tamaño en diferentes regiones del mundo, lo que les permitió encontrar las condiciones óptimas de luz, temperatura y orientación de los fotobiorreactores para su producción.

El escalamiento secuencial del cultivo a la intemperie favoreció la producción de biomasa en el FBR de 150 L en el cual se registró la máxima productividad y la velocidad específica de crecimiento más alta.

En la Figura 25 se muestra la variación del contenido de clorofila *a* en el CM en los tres FBR, y se observa en el FBR de 16 L un aumento constante del contenido de clorofila *a* del cultivo con un valor final de 5 mg L⁻¹.

Durante la cinética en cultivo por lote se observó que la concentración de clorofila *a* se mantuvo prácticamente constante los primeros 7 días de incubación en los FBR de 50 y 150 L, lo que sugiere que se presentó una fase de adaptación de los organismos fotosintéticos presentes en el CM durante estos días (Fig. 25); posteriormente en el FBR de 150 L el contenido de clorofila *a* aumentó de manera exponencial hasta finalizar el experimento con una concentración de 4.1 mg L⁻¹. En contraste, en el FBR de 50 L a partir del día 7 y hasta el día 11 del cultivo por lote, se observa un aumento de la concentración de Chl *a* respecto al tiempo para

posteriormente disminuir del día 12 al 14, estos tiempos coinciden con el cambio en el comportamiento mostrado para la producción de biomasa, lo que indica probablemente el inicio de la desaceleración del crecimiento microbiano (Fig. 24). La máxima concentración obtenida en este FBR fue de 3.7 mg L^{-1} . Los perfiles de clorofila *a* descritos anteriormente probablemente se deban a la adaptación de cada microorganismo que conforma el CM a las diferentes escalas e hidrodinámica de los FBR, así como a las condiciones ambientales (luz y temperatura) ya que los experimentos se hicieron a la intemperie.

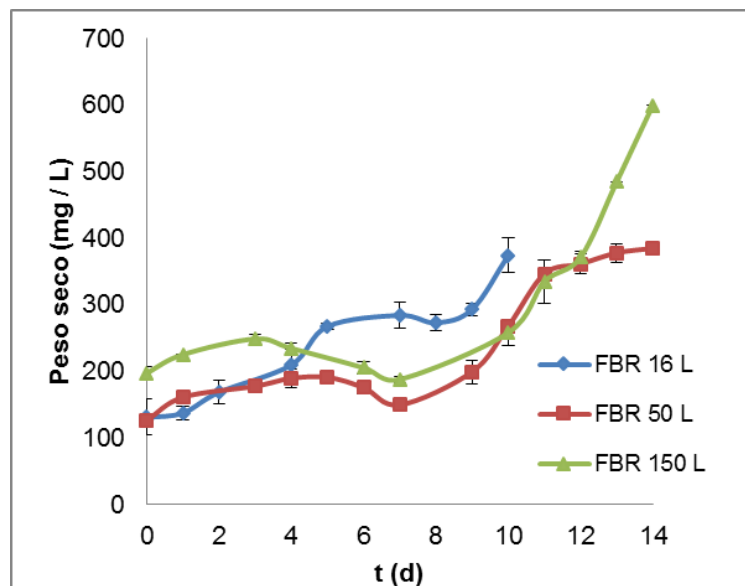


Figura 24. Crecimiento vs tiempo en cultivo por lote en tres FBR a la intemperie (n=3)

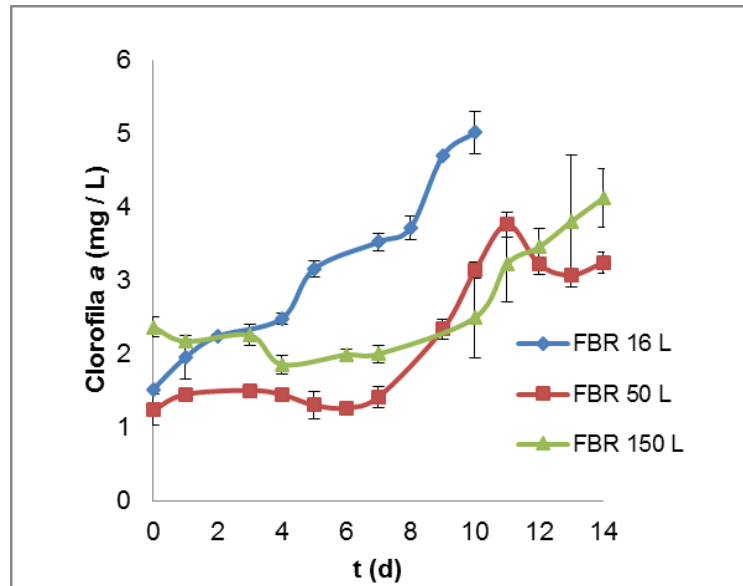


Figura 25. Clorofila a vs tiempo en cultivo por lote en tres FBR a la intemperie (n=3)

El mayor valor del consumo específico de fosfato (Tabla 19) fue de $0.00075 \text{ mg mg}^{-1} \text{ biomasa h}^{-1}$ en el FBR de 16 L, y su concentración final de fosfato en cada lote fue de 10, 2 y 0.25 mg L^{-1} en los FBR de 16, 50 y 150 L respectivamente. Lo anterior demuestra que este compuesto no llegó a convertirse en un nutriente limitante para el crecimiento del CM en los tres FBR.

En la Tabla 19 se presenta la variación del pH a través del tiempo en cada FBR, y se observó que osciló entre 7.1-9.9; estos valores se encuentran dentro del rango de pH (7-10) adecuado para el crecimiento de cada uno de los organismos presentes en el CM y que se presentan en la Tabla 12, además de que su variación a través del tiempo puede afectar el metabolismo, la productividad de las cianobacterias y el funcionamiento de algunas enzimas (Touloupakis *et al.* 2016).

La variación de la concentración de NO_3^- y NH_4^+ en los tres FBR se muestra en la Tabla 19; los valores más elevados fueron 0.67, 0.66 y 0.24 mg L^{-1} de nitratos y 3.96, 3.58 y 3.23 mg L^{-1} de amonio en los FBR de 16, 50 y 150 L respectivamente. Como se mencionó previamente en el apartado 8.5 estudiar la

variación de estos dos nutrientes es importante debido a que en concentraciones elevadas pueden inhibir el funcionamiento del complejo enzimático nitrogenasa (Almon y Boger, 1988; Li *et al.*, 2010). Los valores mostrados para estos dos compuestos en los tres FBR son inferiores a lo reportado en literatura donde se menciona que dichas concentraciones no afectaron el proceso de fijación de nitrógeno.

Los máximos valores de actividad de nitrogenasa se obtuvieron al final de cada cultivo por lote en los tres FBR, y fueron de 1686 nmol eteno L⁻¹ h⁻¹ (4506 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹), 1190 nmol eteno L⁻¹ h⁻¹ (3093 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹) y 2335 nmol eteno L⁻¹ h⁻¹ (4814 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹), para los FBR de 16, 50 y 150 L respectivamente (Tabla 19). Los valores anteriores son 2 veces superiores a lo reportado en literatura para *Anabaena variabilis* Sao (2678 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹) y *Nostoc muscorum* DOH (2237 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹) (Kannaiyan *et al.*, 1997; Kannaiyan, 2002a).

Tabla 19. Resultados globales del desempeño biológico del CM en los tres FBR a la intemperie

FBR	Productividad (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	Consumo PO ₄ ³⁻ (mg mg ⁻¹ biomasa h ⁻¹)	Variación NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	Variación NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	pH	Actividad de nitrogenasa (nmol eteno L ⁻¹ h ⁻¹)
16 L	1.01	0.12	0.00075	0.41-3.96	0.53-0.67	7.13-9.91	678-1686
50 L	0.77	0.13	0.00035	0.52-3.58	0.20-0.66	7.32-9.61	922-1190
150 L	1.19	0.16	0.00016	1.71-3.23	0.17-0.24	7.89-9.64	568-2335

Una vez que se adaptó el inóculo a la intemperie en el fotobiorreactor tipo columna de burbujas de 11 L y conociendo las condiciones de operación para cada FBR, se procedió a la producción por lote secuencial del CM durante tres ciclos en los FBR de 16 y 150 L, y se evaluó el desempeño biológico del cultivo. Los resultados se presentan en los apartados siguientes.

8.7.3 FBR 16 L lote secuencial

En la Tabla 20 y figuras 26-28 se presentan los resultados globales del desempeño biológico del CM durante tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 16 L.

El primer ciclo consistió en un cultivo por lote del CM por 10 días, tiempo que se determinó de acuerdo a la cinética de cultivo presentada anteriormente en el mismo FBR. El experimento inició con una concentración de biomasa en base seca igual a 140 mg L^{-1} , y al día 10 la concentración fue de 425 mg L^{-1} . Al finalizar el lote, se llevó a cabo un recambio del 50 % (cultivo en suspensión por medio de cultivo fresco) para iniciar el segundo ciclo con una concentración de biomasa de 242 mg L^{-1} que al día 6 fue de 500 mg L^{-1} . Posteriormente se realizó el segundo recambio al 50 % iniciando así el tercer ciclo de cultivo, con una concentración de biomasa de 273 mg L^{-1} y una final de 450 mg L^{-1} al día 5. Los valores de productividad en cada ciclo de cultivo fueron 1.19 , 1.79 y 1.47 mg / L h respectivamente.

En la figura 26 se puede observar que el tiempo de residencia hidráulico entre cada ciclo fue disminuyendo hasta obtener el máximo de biomasa establecido, asimismo, se observó un aumento de la velocidad específica de crecimiento por ciclo de cultivo (Tabla 20). Lo anterior pudo deberse a que el inóculo ya estaba adaptado a las condiciones ambientales e hidrodinámicas en el fotobiorreactor, lo que permitió mejorar la productividad de biomasa a través del tiempo, además de que la concentración inicial de inóculo de cada ciclo fue mayor a la del lote inicial y se encontraba en la fase exponencial de crecimiento (Reichert *et al.*, 2006).

El propósito de realizar diferentes ciclos en lote secuencial fue mejorar la productividad de biomasa en el sistema de cultivo microbiano para asegurar la

cosecha constante de biomasa con alta fijación de nitrógeno, que resultan de utilidad como biofertilizante para diferentes plantas. El sistema de cultivo por lote secuencial o semicontinuo ha sido reportado por varios autores para la producción de microalgas en fotobiorreactores de diferente diseño (Zheng *et al.*, 2011; Issarapayup *et al.*, 2009; Travieso *et al.*, 2001). Los autores mencionados anteriormente reportaron incremento en la productividad de biomasa de la microalga en estudio, utilizando un cultivo semicontinuo comparado con un cultivo por lote; situación que también se presentó en el presente estudio. Reichert *et al.*, (2006) mencionan que algunas de las ventajas de trabajar en lote secuencial pueden ser la obtención de una proporción elevada y constante de inóculo, altas tasas de crecimiento, además de ayudar a prolongar la operación de reactores a gran escala.

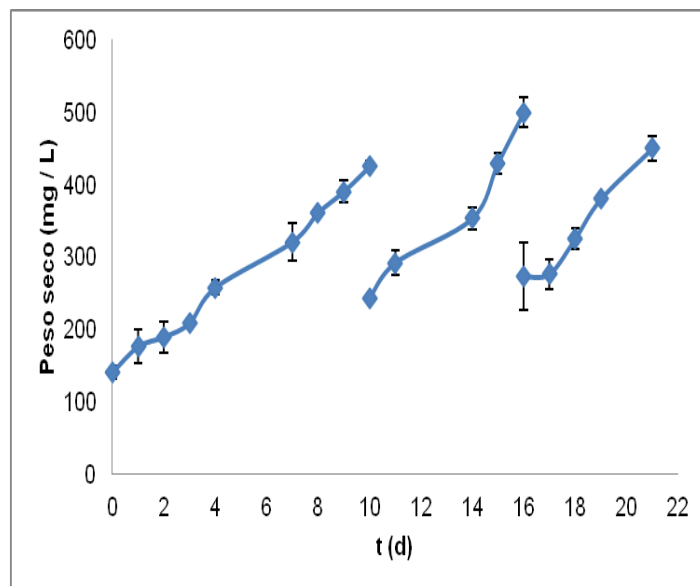


Figura 26. Crecimiento vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 16 L a la intemperie (n=3)

En la figura 27 se observa el comportamiento del contenido de clorofila *a* a través del tiempo en los diferentes ciclos por lote secuencial en el FBR; los valores más altos se obtuvieron al final de cada ciclo y fueron de 4.3, 5.3 y 3.5 mg L⁻¹

respectivamente; el valor más alto se presentó en el segundo ciclo y coincidió con el máximo de biomasa mostrado en la figura 26. El aumento en el contenido de clorofila *a* a través de los diferentes ciclos nos indica la presencia y aumento de los organismos fotosintéticos que conforman el CM.

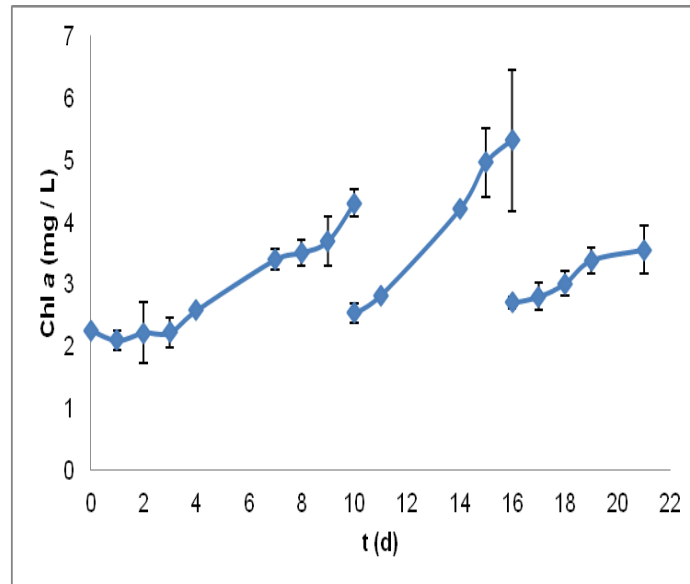


Figura 27. Clorofila *a* vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 16 L a la intemperie

En la figura 28 se muestra la variación de la actividad de nitrogenasa del CM a través del tiempo en cada ciclo donde se observa un aumento del valor final entre cada ciclo de cultivo; los valores obtenidos a los días 10, 16 y 21 corresponden a los recambios y fueron de 2998, 6630 y 4173 nmol eteno L⁻¹ h⁻¹ respectivamente, y equivalen a 7056, 13260 y 9275 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹ para cada ciclo. Los valores anteriores son de 2 a 5 veces superiores a lo reportado en literatura para *Anabaena variabilis* Sao (2678 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹) y *Nostoc muscorum* DOH (2237 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹) (Kannaiyan *et al.*, 1997; Kannaiyan, 2002a) y 1.5 veces superior en el segundo y tercer ciclo de cultivo a lo reportado para *Leptolyngbya valderiana* BDU20041 (9000 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹) (Prabaharan *et al.*, 2010). De igual manera, los valores de actividad de

nitrogenasa reportados para el cultivo por lote secuencial del CM en el FBR 16 L a la intemperie son superiores de 1.5 a 3 veces a lo mencionado previamente en cultivo por lote en el mismo fotobiorreactor.

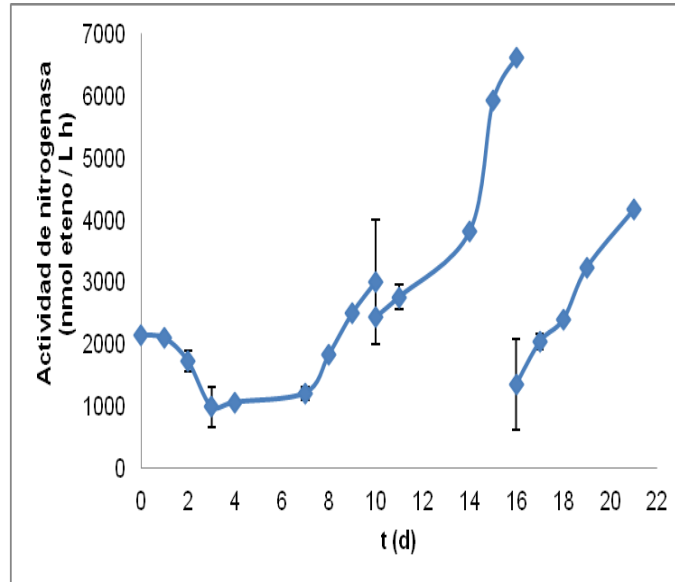


Figura 28. Actividad de nitrogenasa vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 16 L a la intemperie (n=3)

En la Tabla 20 se presenta el consumo específico de fosfato en cada ciclo por lote secuencial, cuyo mayor valor fue de $0.00058 \text{ mg mg}^{-1} \text{ biomasa h}^{-1}$ en el primer ciclo. La concentración final de fosfatos en cada ciclo fue de 7.9, 6.1 y 7.6 mg L^{-1} respectivamente, sin que llegase a ser un nutriente limitante para el crecimiento del CM en el fotobiorreactor a través de los diferentes ciclos de cultivo.

En la Tabla 20 se muestra la variación del pH a través del tiempo en cada ciclo de cultivo y se observa que su valor osciló entre 7.7-9.5, en este intervalo se encuentra el valor de pH adecuado para el crecimiento de los microorganismos que conforman el CM enlistados en la Tabla 12.

En la Tabla 20 se presenta la variación de la concentración de NO_3^- y NH_4^+ en el fotobiorreactor a través del tiempo en los tres ciclos de cultivo. Los valores más altos fueron 0.04, 0.79 y 0.22 mg L^{-1} de nitratos y 2.4, 2.9 y 2.6 mg L^{-1} de amonio

para cada ciclo respectivamente. Los valores obtenidos resultaron inferiores a lo reportado en literatura como inhibitorio para estos dos compuestos, por lo que no interfirieron con la actividad de la enzima encargada del proceso de fijación de nitrógeno (Almon y Boger, 1988; Li *et al.*, 2010).

Tabla 20. Resultados globales del desempeño biológico del CM por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 16 L a la intemperie

FBR 16 L	Productividad (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	Consumo PO ₄ ⁻³ (mg mg ⁻¹ biomasa h ⁻¹)	Variación NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	Variación NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	pH	t (d)
primer ciclo	1.19	0.098	0.00058	0.84-2.4	0.04	7.7-9.1	10
segundo ciclo	1.79	0.11	0.00031	1.82-2.9	0.34-0.79	8.9-9.5	6
tercer ciclo	1.47	0.12	0.00039	1.26-2.6	0.04-0.22	8.4-9.5	5

8.7.4 FBR 150 L lote secuencial

Para mejorar la productividad de biomasa del CM a gran escala, se llevó a cabo una cinética de producción de biomasa en cultivo semicontinuo empleando el FBR de 150 L por tres ciclos. Se monitoreó la variación de la concentración de biomasa en base seca a lo largo del tiempo de incubación durante este régimen de cultivo (Fig. 29). El sistema inició con un cultivo por lote que operó durante 14 días hasta alcanzar una concentración de biomasa de 600 mg L⁻¹ en base seca, posteriormente, se cambió al modo de cultivo semicontinuo con un recambio del 50 % (volumen del cultivo por medio fresco) para los tres ciclos (Fig. 29). La productividad de biomasa en cada ciclo (1^o, 2^o y 3^o) del cultivo semicontinuo fue de 1.82, 1.75 y 2.82 mg L⁻¹ h⁻¹ respectivamente, observándose un aumento en la velocidad específica de crecimiento tras cada ciclo de cultivo (0.0035, 0.0042 y 0.0063 h⁻¹ para el 1^o, 2^o y 3^{er} ciclo respectivamente). Un comportamiento similar fue reportado previamente por Fuentes-Grünewald *et al.* (2015), quienes concluyeron que algunas de las ventajas de trabajar en un sistema semicontinuo son mantener una cantidad de inóculo constante y una alta velocidad específica

de crecimiento. Asimismo, Henrard *et al.* (2011) aumentaron la producción de biomasa y la velocidad específica de crecimiento de *Cyanobium* sp. operando en cultivo semicontinuo un fotobiorreactor tubular vertical de 2 L, con una tasa de recambio del 50 % por 10 ciclos.

La productividad de biomasa del CM obtenida en cultivo semicontinuo en el FBR de 150 L a la intemperie fue aproximadamente dos veces superior a lo obtenido en cultivo por lote empleando el mismo FBR. Este comportamiento ha sido reportado por diversos autores, quienes han estudiado la producción de microalgas en fotobiorreactores de diferentes escalas y geometrías, operando en cultivo semicontinuo, donde lograron mejorar la producción de biomasa comparada con el cultivo por lote (Reichert *et al.* 2006; Sun *et al.* 2009; Bezerra *et al.* 2011).

La temperatura promedio registrada en el interior del FBR de 150 L durante el cultivo semicontinuo fue de $20 \pm 4^{\circ}\text{C}$ y el promedio de luz incidente fue de $233 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estos valores fueron similares a los obtenidos en cultivo por lote en el mismo FBR.

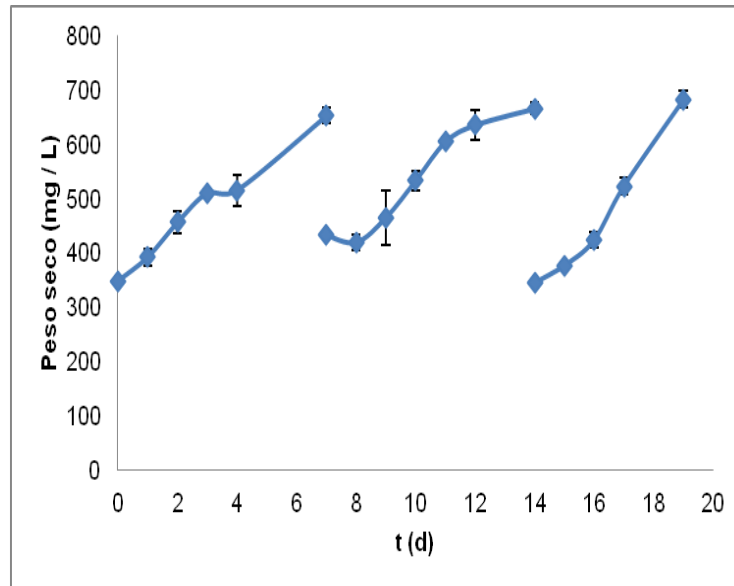


Figura 29. Crecimiento vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 150 L a la intemperie (n=3)

Los resultados de concentración de Chl a obtenidos al final de cada ciclo de cultivo, fueron de 5.9, 6.1 y 6.2 mg L⁻¹, respectivamente (Fig. 30). Con cada cambio de ciclo se incrementó el contenido de Chl a aproximadamente un 5%, lo que indica una adaptación de los organismos fotosintéticos que conforman al CM a la escala del FBR y a las condiciones de luz y temperatura registradas a lo largo del cultivo semicontinuo (19 d).

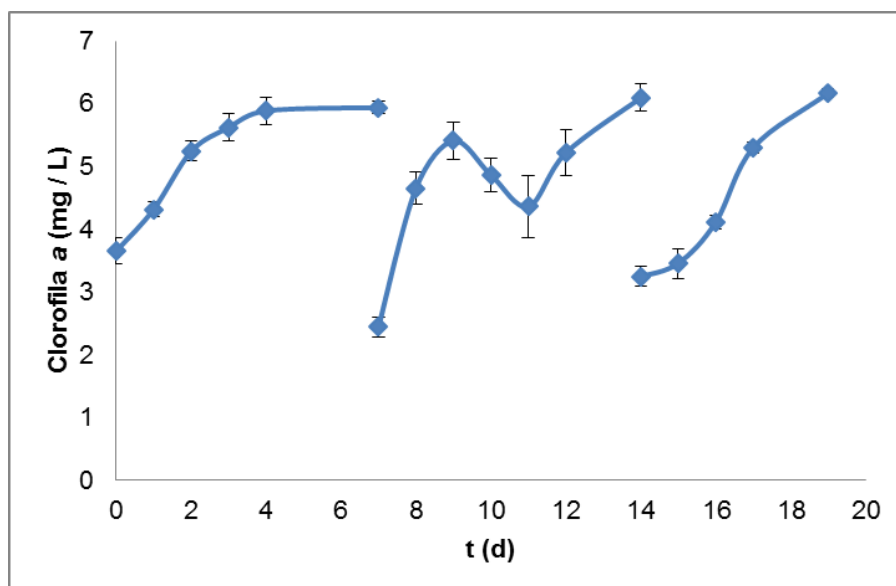


Figura 30. Clorofila a vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 150 L a la intemperie (n=3)

La variación de pH a lo largo del cultivo semicontinuo en los diferentes ciclos se presenta en la Tabla 21, y se observa que los valores fueron similares a los obtenidos previamente en cultivo por lote en el mismo FBR (150 L) y que son adecuados para el crecimiento de los organismos que integran al CM.

Con la finalidad de detectar si los niveles de nitrato y amonio residuales podrían afectar la actividad de nitrogenasa en el sistema de cultivo semicontinuo, se determinó la concentración de estos compuestos a lo largo de los ciclos estudiados y se encontró que los máximos valores registrados fueron 0.79 y 3.19 mg L⁻¹ respectivamente, los cuales no son superiores a los mencionados por Almon y Boger (1988) y Li *et al.* (2010) como inhibidores del funcionamiento de la enzima. Así mismo, se midió la variación de la actividad de nitrogenasa del CM en los tres ciclos y se encontró que los valores máximos al final de cada ciclo fueron 4963, 5366 y 5689 nmol eteno g⁻¹ peso seco h⁻¹ (Fig. 31), superiores a lo obtenido en el cultivo por lote en el mismo FBR y a lo reportado en la literatura (Kannaiyan *et al.* 1997, Kannaiyan 2002). Los resultados muestran que al operar el FBR de 150 L en cultivo semicontinuo se mejora la producción de biomasa sin afectar la fijación de nitrógeno del CM en estudio. Resultados semejantes fueron obtenidos por Moreno *et al.* (2003), quienes estudiaron la producción de *Anabaena* sp. ATCC 33047 en un estanque a la intemperie en un régimen semicontinuo, y demostraron que en el intervalo de temperatura de 21 a 34 ° C en verano se favorece el crecimiento de la cianobacteria sin afectar el proceso de fijación de nitrógeno.

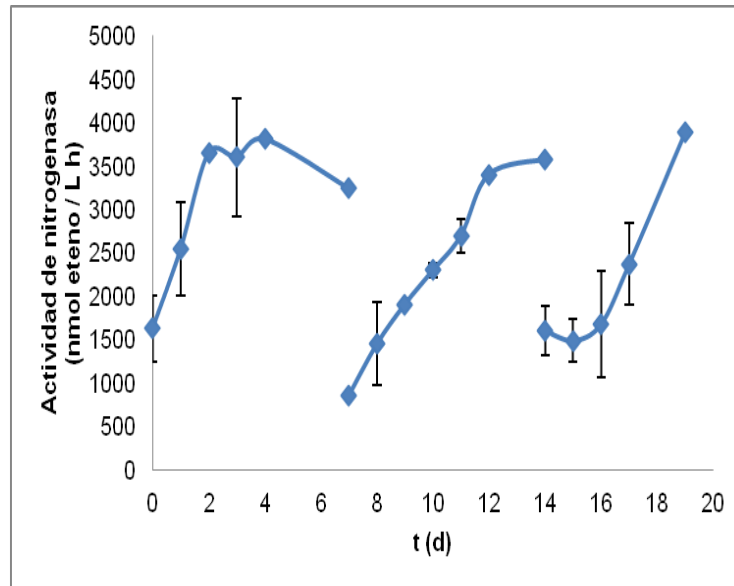


Figura 31. Actividad de nitrogenasa vs tiempo por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 150 L a la intemperie (n=3)

De igual manera, en la Tabla 21 se presenta el consumo específico de fosfato en cada ciclo, el cual alcanzó el valor máximo de $0.00038 \text{ mg mg}^{-1} \text{ biomasa h}^{-1}$ en el tercer ciclo, donde la productividad de biomasa y velocidad específica de crecimiento fue mayor y su concentración final en cada ciclo fue de 0.8, 6.0 y 7.1 mg L^{-1} respectivamente. Con base en los resultados anteriores se puede asegurar que el fosfato no llegó a ser un nutriente limitante para el crecimiento del CM en el fotobiorreactor en ninguno de los ciclos de cultivo.

Tabla 21. Resultados globales del desempeño biológico del CM por tres ciclos en lote secuencial en el FBR de 150 L a la intemperie

FBR 150 L	Productividad ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Consumo PO_4^{3-} ($\text{mg mg}^{-1} \text{ biomasa h}^{-1}$)	Variación NH_4^+ (mg L^{-1})	Variación NO_3^- (mg L^{-1})	pH	t (d)
primer ciclo	1.82 ± 0.049	0.0035	0.00017	1.35-1.74	0.16-0.47	7.7-9.5	7
segundo ciclo	1.75 ± 0.194	0.0042	0.00016	0.98-3.19	0.16-0.79	7.9-9.2	7
tercer ciclo	2.82 ± 0.119	0.0063	0.00038	0.85-1.51	0.17	7.6-10	5

Los resultados obtenidos en la producción del CM en los FBR tanto en condiciones controladas como a la intemperie, muestran una variación importante

en la concentración de biomasa al final de cada cultivo por lote, así como en la actividad de nitrogenasa.

La variación de las condiciones ambientales como luz y temperatura favoreció la producción de biomasa del CM en el FBR de 150 L a la intemperie, pero afectaron la fijación de nitrógeno de este cultivo y aumentaron el pH del cultivo dentro del reactor. Existen numerosos reportes en la literatura que plantean diversas explicaciones de lo que probablemente sucedió con el CM creciendo en el FBR de 150 L, y que permitirán aclarar las variaciones mencionadas previamente.

Algunas de ellas se mencionan a continuación:

1. El incremento de la biomasa fotosintética del CM se favoreció por la variación de luz incidente en el FBR a la intemperie, lo que provocó el aumento de la eficiencia fotosintética y por lo tanto de la concentración de oxígeno dentro del FBR. Dicho aumento aunado al efecto negativo de los cambios de pH, temperatura y/o la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), afectaron la actividad del complejo enzimático nitrogenasa (Moisander *et al.*, 2002; Berman *et al.*, 2003).

1a. Producción de ROS- Singh *et al.* (2010) mencionan que la radiación UV al entrar en contacto con el oxígeno y otros compuestos orgánicos genera ROS y provoca un estrés oxidativo en el alga.

1b. Efecto de la temperatura- Dilworth (1993) estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad del complejo enzimático nitrogenasa de *Azotobacter chroococcum* y demostró que la temperatura óptima para que la enzima lleve a cabo correctamente su función de reducción de nitrógeno es de 30 °C, esta temperatura depende de cada organismo. Gallon *et al.* (1993) demostraron que en un rango de temperatura de 20 a 30 °C y 0.1 atm de O₂ el complejo enzimático

nitrogenasa de *Anabaena cylindrica* realiza correctamente su función; a valores superiores a este rango de temperatura, se reduce su funcionamiento hasta en un 75 %. Lo anterior debido a que en alta temperatura (> 40 °C) cambia la permeabilidad de la membrana permitiendo la difusión del oxígeno hacia el interior del heterocisto, afectando así el funcionamiento de la enzima.

1c. Efecto del pH- Prosperi *et al.* (1993) demostraron que un pH neutro favorece el funcionamiento del complejo enzimático nitrogenasa de *Anabaena variabilis*, y que un pH de 10 inhibe por completo su función. Pham y Burgess (1993) estudiaron la actividad del complejo enzimático nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii* en un rango de pH de 6 a 9.5, y que el óptimo de actividad se presenta a un pH de 7.5. Lo anterior demuestra que el funcionamiento de la enzima se afecta conforme el pH se acerca a los valores extremos del rango estudiado.

2. El valor de pH a lo largo de los cultivos por lote en los FBR pudo verse influido por el incremento de la biomasa fotosintética del CM y el suministro constante de aire al reactor. Shapiro (1997) demostró que el suministro constante de CO₂ al medio de cultivo incrementa el pH hasta valores de 9 y 10, lo que mejora el crecimiento de las cianobacterias al favorecerse la actividad fotosintética. Zhang *et al.* (2002a) asociaron el incremento de pH hasta 9.5 en un fotobiorreactor *flat panel* con el consumo acelerado de CO₂ provocado por la fotosíntesis de las células microalgales.

Con base en lo mencionado anteriormente se puede concluir que cuando existe una variación tan amplia de condiciones ambientales para el crecimiento de microorganismos fotoautótrofos a la intemperie, tiene lugar una competencia por la energía necesaria para cubrir los requerimientos fotosintéticos y la fijación de

nitrógeno; por lo que en ocasiones este último proceso se ve limitado por la energía disponible para realizar la reducción (Lindstrome, 1984).

Para poder demostrar lo mencionado anteriormente es necesario realizar estudios detallados de la actividad fotosintética del CM en los FBR creciendo a la intemperie, así como dar un seguimiento estrecho de cada una de las variables (pH, temperatura, irradiación, etc.) durante el día y todos los días del cultivo por lote, para correlacionarlos con la actividad de nitrogenasa del CM.

8.8 Análisis de costos del bioproceso

El costo de producción del CM en el FBR de 150 L en condiciones controladas y a la intemperie se detalla a continuación. En la Tabla 22 se presenta el costo de cada uno de los consumibles utilizados en el proceso por lote y lote secuencial.

Para realizar el análisis de costos del bioproceso se realizaron las siguientes consideraciones:

- El costo de recuperación de los equipos (inversión en FBR y compresor de aire) se calculó considerando 8 años de operación continua y una tasa de inflación del 20 %.
- El costo del medio de cultivo se calculó considerando el costo del garrafón de agua destilada (\$20) y el costo de las sales minerales por litro de medio de cultivo (\$ 0.88).
- El costo de la energía se calculó considerando el costo del kilo watt hora igual a \$ 0.774 de acuerdo a la Comisión Federal de Electricidad (CFE) (2013).

Tabla 22. Costo de consumibles para la producción del CM en el FBR de 150 L por lote y lote secuencial

Consumibles	Costo de operación (\$) (14 d)	Costo de operación (\$) (19 d)
Fotobiorreactor tipo <i>air-lift</i> de cara plana	286.078	388.24
Compresor de aire tipo tornillo	2200.6	2986.52
Medio de cultivo	111.11	277.77
Energía consumida por lámparas de 40 W	6.93	-----
Energía consumida por el compresor de aire	70.10	95.13

Nota: 14 d de producción en lote, 19 d de producción en lote secuencial

Se estimó un costo aproximado para las diferentes formas de cultivo del CM (lote y lote secuencial), el cual se presenta a continuación:

Producción en cultivo por lote (14 d) de 10.584 g de CM en condiciones controladas de \$ 2674.00 M.N.

Producción en cultivo por lote (14 d) de 59.976 g de CM a la intemperie de \$ 2667.00 M.N.

Producción del CM en lote secuencial (tres ciclos 19 d) de 91.206 g de CM a la intemperie de \$ 3747.00 M.N.

Para hacer una comparación real del costo de producción del biofertilizante (biomasa del CM) en el FBR de 150 L y los fertilizantes comerciales, es necesario realizar una evaluación de la efectividad del consorcio en campo, la cual dependerá del tipo de plantas que se cultiven para poder definir la cantidad de CM necesario para biofertilizarlas.

9. CONCLUSIONES

- El análisis morfológico resultó una herramienta útil para identificar la diversidad de organismos procariotes y eucariotes que conforman el CM, la cual estuvo dominada por las cianobacterias fijadoras de nitrógeno.
- La alta capacidad de fijación de nitrógeno del CM y de producir IAA y solubilizar fósforo, lo vuelven idóneo para su uso como biofertilizante.
- La relación A/V utilizada como criterio de escalamiento resultó determinante para aumentar la producción de biomasa.
- La variación del flujo de aire afectó la productividad de biomasa y la fijación de nitrógeno del CM.
- El cultivo semicontinuo a la intemperie favoreció la producción de biomasa si afectó la fijación de nitrógeno del CM en los FBR de 16 y 150 L.

10. RECOMENDACIONES

- ✓ Estudiar la actividad fotosintética del CM creciendo en los FBR en condiciones controladas y a la intemperie.
- ✓ Estudiar la actividad de nitrogenasa, muestreando por periodos cortos (cada hora) a lo largo del cultivo por lote en los FBR, en condiciones controladas y a la intemperie.
- ✓ Realizar una dinámica de poblaciones a lo largo de los cultivos por lote en cada uno de los FBR estudiados, en las distintas condiciones de operación (controladas e intemperie).
- ✓ Realizar pruebas de biofertilización con el CM producido en los FBR en diferentes cultivos agrícolas en campo.
- ✓ Realizar un análisis costo-beneficio de la aplicación y producción del CM en cultivos agrícolas establecidos en campo.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abuhatab-Aragón** Y. Y., Donato-Rondón J. C. (2012). *Cocconeis placentula* and *Achnantheidium minutissimum*, indicator species of oligotrophic Andean streams. *Caldasia* **34** (1):205-212.
- Adams** D. G., Duggan P. S. (1999). Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New. Phytol.* **144**: 3-33.
- Aguirre** A. G. (2001). Química de los suelos ácidos, templados y tropicales. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 272 pp.
- Ahmed** M., Stal L. J., Hasnain S. (2010). Association of non-heterocystous cyanobacteria with crop plants. *Plant Soil* **336**:363–375.
- Alarcón** A., Ferrera C. R. (2000). Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica en México.* **26** (2): 191-203.
- Almon** H., Boger P. (1988). Nitrogen and Hydrogen Metabolism: Induction and Measurement. En: Packer L., Glazer A.N. (Ed). *Methods in Enzymology.* Academic Press, Inc. San Diego, California, Vol. 167, 459-467 pp.
- Amin** A. S., Parker S. M., Armbrust E. V. (2012). Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**(3):667.
- APHA, AWWA, WPCF** (1971). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 13th Edition. Washington, D.C.
- APHA, AWWA, WPCF** (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th Edition. Washington, D.C.
- Ashwani** K. R., Sharma N. K. (2006) Phosphate metabolism in the cyanobacterium *Anabaena doliolum* under salt stress. *Curr. Microbiol.* **52**: 6–12.

- Babcock** Jr R. W., Malda J., Radway J. C. (2002). Hydrodynamics and mass transfer in a tubular airlift photobioreactor. *J.Appl. Phycol.* **14**: 169–184.
- Babu** S. V., Ashokkumar B., Sivakumar N., Sudhakarsamy P., Varalakshmi P. (2013). Indole-3-acetic acid from filamentous cyanobacteria: screening, strain identification and production. *J. Sci. Ind. Res.* **27**: 581-584.
- Banerjee** M., John J. (2005). Phosphatase activity of non-hair forming cyanobacterium *Rivularia* and its role in phosphorus dynamics in deepwater rice-fields. *Appl. Ecol. Environ. Res.* **3**(1): 55-60.
- Barbosa** M. J., Janssen M., Nienke H., Tramper J., Wijffels R. H. (2003). Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. *Biotechnol. Bioeng.* **82**: 170-179.
- Barbosa** M. J. G. V. (2003). Microalgal photobioreactors: scale-up and optimization. Tesis de Doctorado. Wageningen University. Wageningen, The Netherlands.
- Bauer** K., Díez B., Lugomela C., Seppälä S., Borg A. J., Bergman B.. (2008). Variability in benthic diazotrophy and cyanobacterial diversity in a tropical intertidal lagoon. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**: 205–221.
- Berman** F. I., Lundgren P., Falkowski P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.* **154**: 157-164.
- Bernardet** J. F., Bowman J. P. (2006). The genus *Flavobacterium*. *Prokaryotes* **7**:481–531.
- Bezerra** P. R., Montoya O. E. Y., Sato S., Monteiro de C. J. C., Converti A., Perego P. (2011). Effects of light intensity and dilution rate on the semicontinuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. A kinetic Monod-type approach. *Bioresource Technol.* **102**: 3215–3219

- Bric** J. M., Bostock R. M., Silverstone S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (2): 535-538.
- Brock** J. T., Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2004). Biología de los microorganismos. 10ª Edición. Pearson Education S.A., Madrid. 352, 419-422, 430-432, 598-602 pp.
- Brock** T. D. (1993). Microbiología. 6ª Edición. Prentice Hall Hispanoamericana S. A., México. 770-773 pp.
- Camacho** R. F, Sánchez M. A, Cerón G. M. C, García C. F., Molina G. E., Chisti Y. (2004). Mixing in bubble columns: a new approach for characterizing dispersion coefficients. *Chem. Eng. Sci.* **59**: 4369-4376.
- Carlozzi** P. (2000) Hydrodynamic aspects and *Arthrospira* growth in two outdoor tubular undulating row photobioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**:14–22.
- Carvalho** A. P., Meireles L. A., Malcata F. X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Progr.* **22**: 1490-1506.
- Chalifour** A., Juneau P. (2011). Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine. *Aquat. Toxicol.* **103**: 9-17.
- Chaudhary** V., Prasanna R., Bhatnagar A. K. (2012). Influence of phosphorus and pH on the fungicidal potential of *Anabaena* strains. *J. Basic. Microbiol.* **53**: 201–213.
- Chen** C.Y., Yeh K.L., Aisyah R., Lee D.J., Chang J.S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technol.* **102**, 71-81.

- Cheng** Z. W., Chen J. M., Chen D. Z., Zhang L. L. (2011). Biodegradation of methyl tert-butyl ether in a bioreactor using immobilized *Methylibium petroleiphilum* PM1 cell. *Water Air Soil Poll.* **214**:59–72.
- Chen-Wu** Z., Zmora O., Kopel R., Richmond A. (2001). An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Aquaculture* **195**: 35–49.
- Chisti** M.Y., Moo Y. M. (1988a). Gas holdup in pneumatic reactors. *Chem. Eng. J.* **38**: 149-152.
- Chisti** M. Y., Moo Y. M. (1988b). Hydrodynamics and oxygen transfer in pneumatic bioreactor devices. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 487–494.
- Chisti** M.Y. (1989). Airlift Bioreactors. Elsevier Science Publishing Ltd. Essex UK. 345 pp.
- Chiu** S. Y., Kao C. Y., Chen C. H., Kuan T. C., Ong S. C., Lin C. S. (2008). Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technol.* **99**: 3389-3396.
- Chróst** J., Krambeck H. J. (1986). Fluorescence correction for measurements of enzyme activity in natural waters using methylumbelliferyl-substrates. *Arch. Hydrobiol.* **106** (1): 79-90.
- Clarson** S. J., Steinitz-Kannan M., Patwardhan S. V., Kannan R., Hartig R., Schloesser L., Hamilton D. W., Fusaro J. K. A., Beltz R. (2009). Some observations of diatoms under turbulence. *Silicon* **1**:79–90.
- Contreras** A., García F., Molina E., Merchuk J. C. (1998). Interaction between CO₂-mass transfer, light availability, and hydrodynamic stress on the growth of *Phaeodactylum tricornutum* in a concentric tube airlift photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **60**: 317-325.

- Contreras F. C.,** Peña C. J. M., Flores C. L. B., Cañizares V. R. O. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia* **28**: 450-456.
- De Nobel W. T.,** Huisman J., Snoep J. L., Mur L. R. (1997). Competition for phosphorus between the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 259-267.
- Dilworth M. J.,** Eldridge M. E., Eady R. R. (1993). The molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*: effect of elevated temperature on N₂ reduction. *Biochem. J.* **289**: 395-400.
- Doucha J,** Straka F, Li'vansky' K. (2005). Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* **17**: 403–412.
- Eroğlu I.,** Tabanoğlu A., Gündüz U., Eroğlu E., Yücel M. (2008). Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 in a flat plate solar bioreactor. *Int. J. Hydrogen Energ.* **32**: 531-541.
- Franco L. J.,** de la Cruz A. G., Cruz G. A., Rocha R. A., Navarrete S. N., Flores M. G., Kato M. E., Sánchez C. S, Abarca A. L. G., Bedia S. C. M. (2001). Manual de Ecología. Trillas, México 132-133 pp.
- Fuentes-Grünwald C.,** Bayliss C., Zanain M., Pooley C., Scolamacchia M., Silkina A. (2015). Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier Transform Infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production. *Bioresource Technol.* **189**: 357–363

- Gajda** I., Greenman J., Melhuish C., Ieropoulos I. (2015). Self-sustainable electricity production from algae grown in a microbial fuel cell system. *Biomass Bioenerg* **82**: 87-93
- Galaction** A., Cascaval D., Camarut S. (2010). Analysis of distribution of oxygen transfer rate in stirred bioreactors for yeasts broths. *Rom. Biotechnol. Lett.* **15**: 5423–5435.
- Gallon** J. R., Pederson D. M., Smith G. D. (1993). The effect of temperature on the sensitivity of nitrogenase to oxygen in the cyanobacteria *Anabaena cylindrica* (Lemmerniann) and *Gloeothoece* (Nägeli). *New Phytol.* **124**: 251-25.
- Gamal** E. H., Elbanna K. (2011). Field evidence for the potential of *Rhodobacter capsulatus* as biofertilizer for flooded rice. *Curr. Microbiol.* **62**: 391–395.
- Gärdes** A., Iversen H. M., Grossart H. P., Passow U. (2011). Diatom-associated bacteria are required for aggregation of *Thalassiosira weissflogii*. *ISME J.* **5**:436–445.
- Glickmann** E., Dessaux Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski Reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (2): 793–796.
- González** S., Peñalosa C. (2000). Biomoléculas, métodos de análisis. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México, ENEPI. México. 196 pp.
- Goyal** S. K. (2002). A profile on algal biofertilizer. En: Kannaiyan, S. (Ed.) *Biotechnology of Biofertilizers*. Narosa Publishing House, New Delhi, India. 250-258 pp.
- Grainger** S. L. J., Peat A., Tiwari D. N., Whitton B. A. (1989). Phosphomonoesterase activity of the cyanobacterium *Calothrix parietina*. *Microbios* **59**: 7-17.

- Grewe**, C. B., Pulz, O. (2012). The Biotechnology of Cyanobacteria. In: Whitton, B. A. (Ed.). Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. Springer Science+Business Media, 707-733 pp.
- Grobbelar** J. U. (2000). Physiological and technological consideration for optimizing mass algal cultures. *J. Appl. Phycol.* **12**: 201-206.
- Hadas** O., Pinkas R., Malinsky-Rushansky N., Shalev-Alon G., Delphine E., Berner T., Sukenik A., Kaplan A. (2013). Physiological variables determined under laboratory conditions may explain the bloom of *Aphanizomenon ovalisporum* in Lake Kinneret. *Eur. J. Phycol.* **37**: 259-267.
- Hashtroudi** M. S., Ghassempour A., Riahi H., Shariatmadari Z. (2012). Endogenous auxins in plant growth-promoting cyanobacteria—*Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicola*. *J. Appl. Phycol.* **25**: 379-386.
- He** D., Bultel Y., Magnin J. P., Willison J. C. (2006). Kinetic analysis of photosynthetic growth and photohydrogen production of two strains of *Rhodobacter capsulatus*. *Enzyme Microb. Technol.* **38**: 253-259.
- Hena**, S., Fatimah S., Tabassum S.. (2015). Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Res. Industry* **10**: 1-14.
- Henrard** A.A., de Morais M.G. y Costa J.A.V. (2011). Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium* sp. *Bioresource Technol.* **102**: 4897-4900.
- Hernández** M. D. (2009). Identificación de los componentes de un consorcio microbiano fotosintético fijador de nitrógeno y su variación poblacional durante su crecimiento en lote en un fotobiorreactor. Tesis de maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN, México. 73 pp.

- Höffner**, K., Barton P. I.. (2014). Design of Microbial Consortia for Industrial Biotechnology. Proceedings of the 8th International Conference on Foundations of Computer-Aided Process Design – FOCAPD 2014. 1-10. pp.
- Hsieh** C. H., Wu W.T. (2009). A novel photobioreactor with transparent rectangular chambers for cultivation of microalgae. *Biochem. Eng. J.* **46**: 300-305.
- Hu** Q., Guterman H., Richmond A. (1996). A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. *Biotechnol. Bioeng.* **51**: 51-60.
- Innok** S., Chunleuchanon S., Boonkerd N., Teaumroong N. (2009). Cyanobacterial akinete induction and its application as biofertilizer for rice cultivation. *J. Appl. Phycol.* **21**:737–744.
- Issarapayup** K., Powtongsookb S., Pavasant P. (2009). Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*. *J. Biotechnol.* **142**: 227-232.
- Janssen** M, Tramper J, Mur L. R, Wijfels R. H. (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnol. Bioeng.* **81**: 193-210.
- Kaewpintong** K., Shotipruk A., Powtongsook S., Pavasant P. (2007). Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technol.* **98**: 288–295.
- Kannaiyan** S. (1989). *Azolla* biofertilizer for rice. En: Proc. Natl. Seminar on Biotech. Mol. Biol. C.M.S. College, Kottayam, Kerala, India. 15 pp.
- Kannaiyan** S. (1990). Blue green algae biofertilizers. En: Kannaiyan S. (ed.). *Biotechnology of biofertilizers for rice crop*. Tamil Nadu Agric. Univ. Publication, Coimbatore, Tamil Nadu, India. 225 pp.

- Kannaiyan S.** (2002a) Ammonia production by the immobilized cyanobacteria for rice crop. In: Kannaiyan S. (ed.) *Biotechnology of Biofertilizers*. Narosa Publishing House, New Delhi, India, 293–298 pp.
- Kannaiyan, S.** (2002b) Biofertilizers for sustainable crop production. En: Kannaiyan S. (ed.) *Biotechnology of Biofertilizers*. Narosa Publishing House, New Delhi, India, 9–49 pp.
- Kannaiyan S., Aruna S. J., Merina P. K. S. Hall D. O.** (1997). Immobilized cyanobacteria as a biofertilizer for rice crops. *J. Appl. Phycol.* **9**: 167–174.
- Kantachote D., Nunkaew T., Kantha T., Chaiprapat S.** (2016). Biofertilizers from *Rhodospseudomonas palustris* strains to enhance rice yields and reduce methane emissions. *Appl. Soil Ecol.* **100**: 154–161
- Kargi F., Moo-Young M.** (1985). Transport Phenomena in Bioprocesses. En: Moo-Young M. (Ed.) *Comprehensive Biotechnology Vol.2* 1st Ed. Pergamon Press Oxford U.K.
- Karthikeyan N., Prasanna R., Nain L., Kaushik B. D.** (2007). Evaluating the potential of plant growth promoting cyanobacteria as inoculants for wheat. *Eur. J. Soil Biol.* **43**: 23-30.
- Koku H., Eroğlu I., Gündüz U., Yücel M., Türker L.** (2003). Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *Int. J. Hydrogen Energ.* **28**: 381–388.
- Komárek J.** (2010). Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. *Hydrobiologia* **639**: 231–243.
- Kovács C., Kahlert M., Padisák J.** (2006). Benthic diatom communities along pH and TP gradients in Hungarian and Swedish stream. *J. Appl. Phycol.* **18**: 105–117.

Krammer K., Lange-Bertalot H. (1986). 2/1. Bacillariophyceae. 1. Teil: Naviculaceae. En: Süßwasserflora von Mitteleuropa. (Eds Ettl H, J Gerloff, Heynig H and Mollenhauer D.) 876 pp. (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart).

Krammer K., Lange-Bertalot H. (1988). 2/2. Bacillariophyceae. 2. Teil: Bacillariaceae. Epithemiaceae. Surirellaceae. En: Süßwasserflora von Mitteleuropa. (Eds Ettl H, J Gerloff, Heynig H and Mollenhauer D.) 596 pp. (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart).

Krammer K., Lange-Bertalot H. (1991a). 2/3. Bacillariophyceae. 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. En: Süßwasserflora von Mitteleuropa. (Eds Ettl H, J Gerloff, Heynig H and Mollenhauer D.) 576 pp. (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart).

Krammer K., Lange-Bertalot H. (1991b). 2/4. Bacillariophyceae. 4. Teil: Achnanthaceae. Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lineolatae) und Gomphonema. En: Süßwasserflora von Mitteleuropa. 437 pp. (Eds Ettl, H., Gartner, G., Gerloff, J., Heynig, H and Mollenhauer, D.) (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart).

Kruskopf M. M., Plessis S. D. (2004). Induction of both acid and alkaline phosphatase activity in two green-algae (chlorophyceae) in low N and P concentration. *Hydrobiologia* **513**: 59–70.

Kumar K., Dasgupta C. N., Nayak B., Lindblad P., Das D. (2011). Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technol.* **102**: 4945–4953

Li J., Stamato M., Velliou E., Jeffryes C., Agathos N. S. (2015). Design and characterization of a scalable airlift flat panel photobioreactor for microalgae cultivation. *J. Appl. Phycol.* **27**: 75–86.

- Li Z.**, Yu J., Kyoung-Rae K., Brand J. (2010). Nitrogen fixation by a marine non-heterocystous cyanobacterium requires a heterotrophic bacterial consort. *Environ. Microbiol.* **12**(5):1185–1193.
- Lindstrom K.** (1984). Analysis of factors affecting in situ nitrogenase (C₂H₂) activity of *Galega orientalis*, *Trifolium pratense* and *Medicago sativa* in temperate conditions. *Plant Soil* **79**: 329-341.
- Ludwig-Müller J** (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot.* **62**:1757–1773.
- Luo X.**, Zhang J., Tsuchiya K., Fan L. S. (1997). On the rise velocity of bubbles in liquid-solid suspensions at elevated pressure and temperature. *Chem. Eng. Sci.* **52**: 3693-3699.
- Lürling M.**, Eshetu F., Faassen E. J., Kosten S., Husza V. L. M. (2013). Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biol.* **58**: 552–555.
- Masukawa H.**, Sakurai H., Hausinger P. R., Inoue K. (2014). Sustained photobiological hydrogen production in the presence of N₂ by nitrogenase mutants of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena*. *Int. J. Hydrogen Energ.* **39**, 19444-19451
- Megharaj M.**, Pearson H. W., Venkateswarlut K. (1992). Removal of nitrogen and phosphorus by immobilized cells of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil. *Enzyme. Microb. Technol.* **14**:656-658.
- Mehnert G.**, Leunert F., Cirés S., Jöhnk K. D., Rucker J., Nixdorf B., Wiedner C. (2010). Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. *J. Plankton Res.* **32** (7): 1009-1021.

- Moisander** P. H., McClinton E., Paerl H. W. (2002). Salinity effects on growth, photosynthetic parameters, and nitrogenase activity in estuarine planktonic cyanobacteria. *Microb. Ecol.* **43**: 432-442.
- Morales** E., Rodríguez M., García D., Loreto C., Marco E. (2002) Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC7120 en función del pH y CO₂. *Interciencia* **27**: 373-378.
- Moreno** J., Vargas M.A., Rodríguez H., Rivas J., Guerrero M.G. (2003). Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047. *Biomolecular Eng.* **20**: 191-197
- Mott** L. R. (2006) Mecánica de fluidos. 6ta edición. Pearson Educación, México, 14 pp.
- Muñoz** H., Armienta M. A., Vera A., Ceniceros N. (2004). Nitrato en el agua subterránea del Valle de Huamantla, Tlaxcala, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **20**: 91-97.
- Muñoz**, R., Alvarez M. T., Muñoz A., Terrazas E., Guieysse B., Mattiasson B.. (2006). Sequential removal of heavy metals ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium. *Chemosphere* **63**: 903–911
- Nain** L., Rana A., Joshi M., Jadhav S. D., Kumar D., Shivay Y. S., Paul S., Prasanna R. (2010) Evaluation of synergistic effects of bacterial and cyanobacterial strains as biofertilizers for wheat. *Plant Soil.* **331**: 217-230.
- Nakatsu** C. H., Hristova K., Hanada S., Meng X. Y., Hanson J. R., Scow K. M., Kamagat Y. (2006). *Methylibium petroleiphilum* gen. nov., sp. nov., a novel methyl tert-butyl ether-degrading methylotroph of the Betaproteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 983–989.

- Nalewajko** C., Murphy T. P. (2001). Effects of temperature, and availability of nitrogen and phosphorus on the abundance of *Anabaena* and *Microcystis* in Lake Biwa, Japan: an experimental approach. *Limnol.* **2**:45–4.
- Ogbonna** J. C., Yada H., Masui H., Tanaka H. (1996). A novel internally illuminated stirred tank photobioreactor for large-scale cultivation of photosynthetic cells. *J. Ferment. Bioeng.* **82** (1): 61-67.
- Osman** M. E. H., El-Sheekh M. M., El-Naggar A. H., Gheda S. F. (2010) Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant. *Biol. Fertil. Soils.* **46**: 861-875.
- Otero** A., Vincenzini M. (2004). *Nostoc* (cyanophyceae) goes nude: extracellular polysaccharides serve as a sink for reducing power under unbalanced C/N metabolism. *J. Phycol.* **40**: 74–81.
- Paerl** H. W. (1990). Physiological ecology and regulation of N₂ fixation in natural waters. *Adv. Microb. Ecol.* **11**: 305-344.
- Paerl** H. W., Pinckney J. L. (1996). A mini-review of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb. Ecol.* **31**: 225-247.
- Patel** A., Barrington S., Lefsrud M. (2012). Microalgae for phosphorus removal and biomass production: a six species screen for dual-purpose organisms. *GCB Bioenergy* **4**: 485–495.
- Pereira** I., Ortega R., Barrientos L., Moya M., Reyes G., Kramm V. (2009) Development of a biofertilizer based on filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria for rice crops in Chile. *J. Appl. Phycol.* **21**: 135-144.
- Pham** D. N., Burgess B. K. (1993). Nitrogenase reactivity: effects of pH on substrate reduction and CO inhibition. *Biochemistry* **32**: 13725-13731.

- Pikovskaya** R.I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* **17**: 362–370.
- Posten** C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.* **9** (3): 165–177.
- Pot** B., Gillis M., De Ley J. (2006). The genus *Aquaspirillum*. *Prokaryotes* **5**: 710–722.
- Prabaharan** D., Kumar D. A., Uma L., Subramanian G. (2010). Dark hydrogen production in nitrogen atmosphere-an approach for sustainability by marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* BDU 20041. *J. Hydrogen Energ.* **35**: 10725-10730.
- Prasanna** R., Adak A., Verma S., Bidyarani N., Babu S., Pal M., Shivay S. Y., Nain L. (2015). Cyanobacterial inoculation in rice grown under flooded and SRI modes of cultivation elicits differential effects on plant growth and nutrient dynamics. *Ecol. Eng.* **84**: 532–541.
- Prasanna** R., Jaiswal P., Nayak S., Sood A., Kaushik B. D. (2009). Cyanobacterial diversity in the rhizosphere of rice and its ecological significance. *Indian J. Microbiol.* **49**:89–97.
- Prosperi** C., Luna C., Fernandez V. E. (1993). Influence of pH, light intensity and oxygen on the short-term effect of ammonium on nitrogenase activity of cyanobacteria from rice fields. *Environ. Exp. Bot.* **33** (4): 545-552.
- Pulz** O. (1992). Open air and semi-closed cultivation systems for the mass cultivation of microalgae, In: Proceedings of the First Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Pulz** O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**:287–293.

- Rajasekhar N., Sasikala Ch., Raman Ch. V.** (1999). Photoproduction of indole 3-acetic acid by *Rhodobacter sphaeroides* from indole and glycine. *Biotechnol. Lett.* **21**: 543–545.
- Rana A., Joshi M., Prasanna R., Shivay S. Y., Nain L.** (2012). Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *Eur. J. Soil Biol.* **50**: 118-126.
- Reichert C. C., Reinehr C. O., Costa J. A. V.** (2006). Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Braz. J. Chem. Eng.* **23** (1): 23-28.
- Rennie R.J.** (1981). A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* **27**: 8-14.
- Reyna-Velarde R.** (2010). Producción de consorcios microbianos fotosintéticos fijadores de nitrógeno en fotobiorreactores en condiciones controladas y a la intemperie. Tesis de doctorado. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN, México.
- Reyna-Velarde R., Hernández-Melchor DJ, Vázquez-Hernández M, Cañizares-Villanueva RO** (2012) Isolation of a photosynthetic microbial consortium formed mainly by cyanobacteria with capacity to fix nitrogen. *Int. J. Environ. Eng.* **4**(3/4):183-196
- Reyna-Velarde R., Cristiani-Urbina. E., Hernández-Melchor D., Thalasso F., Cañizares-Villanueva R. O.** (2010). Hydrodynamic and mass transfer characterization of a flat-panel airlift photobioreactor with high light path. *Chem. Eng. Process.* **49**: 97-103.
- Richmond A., Cheng-Wu Z.** (2001). Optimization of a flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. outdoors. *J. Biotechnology* **85**: 259–269.

- Rippka** R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 1-61.
- Rivas** R., Velázquez E., Willems A., Vizcaíno N., Subba-Rao S. N., Mateos F. P., Gillis M., Dazzo B. F., Martínez-Molina E. (2002). A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(11):5217.
- Rodríguez** H., Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* **17**: 319–333.
- Roubex** V., Lancelot C. (2008). Effect of salinity on growth, cell size and silicification of an euryhaline freshwater diatom: *Cyclotella meneghiniana* Kütz. *Transit. Waters Bull.* **1**: 31-38.
- Rushforth** F.E., Kaczmarska I., Johansen J.R. (1984). The subaerial diatom flora of Thurston lava tube, Hawaii. *Bacillaria* **7**:135-157.
- Sánchez** M. A, García C. F., Contreras G. A., Molina G. E., Chisti Y. (2000). Bubble-column and airlift photobioreactors for algal culture. *AIChE J.* **46**: 1872-1887.
- Setaro** F. V., Melack J. M. (1984). Responses of phytoplankton to experimental nutrient enrichment in an Amazon floodplain lake. *Limnol. Oceanogr.* **29** (5): 972-984.
- Shafik** H. M., Herodek S., Présing M., Vörös L., Balogh K.V.(1997). Growth of *Cyclotella meneghiniana* Kutz. II. Growth and cell composition under different growth rates with different limiting nutrient. *Annh Limnol.* **33** (4): 223-233.
- Shapiro** J. (1997). The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes. *Freshwater Biol.* **37**: 307-323.

- Sierra E.**, Acién F.G., Fernández J.M., García J.L., González C., Molina E. (2008). Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chem. Eng. J.* **138**:136–147.
- Silaban A.**, Bai R., Gutierrez-Wing M. T., Negulescu I. I., Rusch K. A. (2014). Effect of organic carbon, C: N ratio and light on the growth and lipid productivity of microalgae/cyanobacteria coculture. *Eng. Life Sci.* **14 (1)**:47-56.
- Singh S. P.**, Häder D. P., Sinha R. P. (2010). Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing Res. Rev.* **9**: 79-90.
- Singh V.**, Chaudhary K. D., Mani I., Dhar K. P. (2016). Recent advances and challenges of the use of cyanobacteria towards the production of biofuels. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **60**: 1–10.
- Slegers P.M.**, Wijffels R.H., van Straten G., van Boxtel A.J.B. (2011). Design scenarios for flat panel photobioreactors. *Appl. Energ.* **88**: 3342-3353
- Srivastava A. K.**, Bhargava P., Ara A., Mishra Y., Rai S.P., Rai L.C. (2007). A rapid and cost-effective method of genomic DNA isolation from cyanobacterial culture, mat and soil suitable for genomic fingerprinting and community analysis. *J. Appl. Phycol.* **19**: 373-382.
- Stihl A.**, Sommer U., Post A. F. (2001). Alkaline phosphatase activities among populations of the colony-forming diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium* spp. (Cyanobacteria) in the Red Sea. *J. Phycol.* **37**: 310–317.
- Subashchandrabose, S. R.**, Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnol. Adv.* **29**: 896–907.
- Sun L.**, Zhang S., Wang C., Shi L. (2009). Effects of renewal regime on consumption of nitrogen and phosphorus, biomass and polysaccharide production

by *Porphyridium cruentum* in semicontinuous culture. Memorias. 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICBBE). Beijing, China, 11-13 Junio.

Taton A., Lis E., Adin D. M., Dong G., Cookson S., Kay S. A., Golden S. S., Golde J. W. (2012). Gene transfer in *Leptolyngbya* sp. strain BL0902, a cyanobacterium suitable for production of biomass and bioproducts. *PLoS ONE* **7**(1): e30901.

Tebo B. M., Geszvain K., Sung-Woo L. (2010). The molecular geomicrobiology of bacterial manganese (II) oxidation. En: Barton L. L., Mandl M., Loy A. (Eds) *Geomicrobiology: molecular and environmental perspective*. Springer, Oregon, 285-308 pp.

Thajuddin N., Subramanian G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Curr. Sci.* **89**(1): 47-57.

Thayumanavan B., Parvathy K. (2002). Biochemistry of nitrogen fixation and assimilation. En: Kannaiyan, S. (Ed.) *Biotechnology of Biofertilizers*. Narosa Publishing House, New Delhi, India. 74-83 pp.

Tilman D., Kilham S. S. (1976). Phosphate and silicate growth and uptake kinetics of the diatoms *Asterionella formosa* and *Cyclotella meneghiniana* in batch and semicontinuous culture. *J. Phycol.* **12**: 375-383.

Touloupakis E., Cicchi B., Benavides S. A. M., Torzillo G. (2016). Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poterioochromonas* sp.). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 1333-1341

Travieso L., Hall D.O., Rao K.K., Benítez F., Sánchez E., Borja R. (2001). A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. *Int. Biodeter. Biodegr.* **47**: 151-155.

- Tredici** M. R. (2004). Mass production of microalgae: photobioreactors. En: Richmond, A. (Ed.) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd. Oxford. 178-214 pp.
- Tredici** M. R., Carlozzi P., Chini-Zitelli G., Materassi R. (1991). A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technol.* **38**: 153-159.
- Trejo** A., de-Bashana L. E., Hartmann A., Hernandez J. P., Rothballer M., Schmid M., Bashan Y. (2012). Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. *Environ. Exp. Bot.* **75**: 65–73.
- Tsygankov** A.A., Serebryakova L.T., Sveshnikov D.A., Rao K.K., Gogotov I.N., Hall D.O. (1997). Hydrogen photoproduction by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and the dependence on pH. *Int. J. Hydrogen Energy* **22**: 859-867.
- Tuji** A. (2000). The effect of irradiance on the growth of different forms of freshwater diatoms: implications for succession in attached diatom communities. *J. Phycol.* **36**: 659-661.
- Ugwu** C. U., Aoyagi H., Uchiyama H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technol.* **99**: 4021–4028.
- van der Grinten** E., Janssen A. P. H. M., de Mutsert K., Barranguet C., Admiraal W. (2005). Temperature- and light-dependent performance of the cyanobacterium *Leptolyngbya foveolarum* and the diatom *Nitzschia perminuta* in mixed biofilms. *Hydrobiologia* **548**:267–278.

- van der Grinten E., Janssen M., Simis S. G. H., Barranguet C., Admiraal W.** (2004). Phosphate regime structures species composition in cultured phototrophic biofilm. *Freshwater Biol.* **49**: 369–381.
- Vasseur C., Bougaran G., Garnier M., Hamelin J., Leboulanger C., Chevanton M. L., Mostajir B., Sialve B., Steyer J.P., Fouilland E.** (2012). Carbon conversion efficiency and population dynamics of a marine algae–bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate: First step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion. *Bioresource Technol.* **119**: 79–87.
- Venkataraman G.S.** (1981). Blue-green algae for rice production. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, IT. 102 p.
- Wartiainen I., Eriksson T., Zheng W., Rasmussen U.** (2008). Variation in the active diazotrophic community in rice paddy—nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Appl. Soil Ecol.* **39**: 65–75.
- Weeks O. B., Beck S. M.** (1960). Nutrition of *Flavobacterium aquatile* strain Taylor and a microbiological assay for thiamine. *J. Gen. Microbiol.* **23**: 217-229.
- Wehr J. D., Sheath R. G.** (2003). Freshwater Algae of North America; Ecology and Classification. Academic Press. San Diego, California. 918 pp.
- White D.** (2000). The physiology and biochemistry of prokaryotes. 2^a Edición. Oxford. N. Y. 319-323 pp.
- Whitton B. A., Clegg E., Christmas M., Gemmell J. J., Robinson P. J.** (1999). Development of phosphatase assay for monitoring nutrients in rivers: Methodology manual for measurements of phosphatase activity in mosses and green algae in rivers. Agency R & D. Technical Report Reference Num. E106. 39 pp.

- Whitton** B. A., Grainger S. L. J., Hawley G. R. W, Simon J. W. (1991). Cell-bound and extracellular phosphatase activities of cyanobacterial isolates. *Microb. Ecol.* **21**: 85-98.
- Whitton** B.A., Potts M. (2000). The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 66-67 pp.
- Wolk** C. P. (1996). Heterocyst formation. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 59-78.
- Yoon** J. H., Kang S. J., Park S., Oh T. K. (2007). *Devosia insulae* sp. nov., isolated from soil, and emended description of the genus *Devosia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1310–1314.
- Yu** X., Zhao P., He C., Li J., Tang X., Zhou J., Huang Z. (2012). Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresour. Technol.* **121**: 256-262.
- Zhang** J. Y., Ni W. M., Zhu Y. M., Pan Y. D. (2013). Effects of different nitrogen species on sensitivity and photosynthetic stress of three common freshwater diatoms. *Aquat. Ecol.* **47**:25–35.
- Zhang** K., Kurano N., Miyachi S. (2002a). Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **25**: 97-101.
- Zhang** K., Liu Z., Wang S., Jiang P. (2002b). Characterization of a bioflocculant produced by the marine myxobacterium *Nannocystis* sp. NU-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**:517–522.
- Zhang** K., Miyachi S., Kurano N. (2001). Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass

productivity and irradiation utilization efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**:428–433.

Zheng Y., Chen Z., Lu H., Zhang W. (2011). Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by *Tetraselmis subcordiformis* in a rectangular airlift photobioreactor. *Afr. J. Biotechnol.* **10** (10): 1888-1901.

Zittelli G. C., Rodolfi L., Biondi N., Tredici M. R. (2006) Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* **261**:932–943.

ANEXO I

Composición del medio de cultivo BG-11₀ (Rippka *et al.*, 1979)

Compuesto	g / L	Sol. patrón g / 100mL
NaCl	0.023	2.3
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0.04	4.0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.075	7.5
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.036	3.6
Ac. Cítrico	0.006	0.6
Citrato férrico	0.006	0.6
EDTA (sal disódica)	0.001	0.1
Na ₂ CO ₃	0.02	2.0
Sol. Oligoelementos*	1 mL / L	
Agua desionizada	1000 mL	

*Solución de oligoelementos del medio BG-11₀

Compuesto	g / 100mL
H ₃ BO ₃	0.286
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.181
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.0222
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.0390
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.0079
Co(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	0.00494

METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO BIOLÓGICO DEL CM

Determinación de peso seco. Tredici *et al.* (1991).

Procedimiento:

- Se toma un volumen de 15 mL de suspensión del cultivo
- Se colectan las células mediante filtración

- Se utilizan membranas de nitrocelulosa de 5µm, las cuales se colocan a peso constante a 105°C por 24 h
- Calcular el peso seco de la biomasa, reportando como mg biomasa / mL

Actividad de nitrogenasa mediante ensayo de reducción de acetileno. Venkataraman (1981).

Procedimiento:

- Se lleva a cabo en viales de 25 mL de capacidad
- Colocar 10 mL de suspensión del consorcio
- Se reemplaza 1 mL de la atmósfera interior por 1 mL de acetileno 1%
- Se incuba por 192 h con iluminación de 80 µmol fotones m⁻² s⁻¹ y un fotoperiodo 12:12 horas luz:oscuridad y una temperatura de 21 °C
- Se analiza la fase gaseosa en cromatógrafo de gases (Varian CP3380 FID) en busca de eteno, bajo las siguientes condiciones: T columna = 60°C, T inyector = 200 °C, T detector = 250°C, Columna: Carbowax 1540/Porapak Q 1/8" x 6 ft, acarreador: N gas, 15 psi y un flujo de 600 mL/min.

Cuantificación de pigmentos (Brock *et al.*, 2004)

Procedimiento:

- Colocar 5 mL del cultivo en un tubo
- Centrifugar a 3000 rpm por 15 min
- Retirar el sobrenadante
- Adicionar 5 mL de Metanol al 90 %
- Calentar a baño maría por 10 min a 70 °C tapando la boquilla del tubo con parafilm
- Guardar en refrigeración en oscuridad por 24 h
- Transcurrido el tiempo, centrifugar a 3000 rpm por 15 min

- Leer el sobrenadante en una celda de plástico en un espectrofotómetro a 666, 653 y 470 nm
- Se calcula el contenido de clorofila *a* con las siguientes ecuaciones y se hace un promedio de los resultados obtenidos:

Clorofila *a* mg/ L = 13.9 (Abs 665 nm- Abs 750nm)

Clorofila *a* mg / L = 15.68 (Abs 666 nm) – 7.34 (Abs 653 nm)

Cuantificación de fósforo inorgánico (Pi) (González y Peñalosa 2000)

Reactivos

1. Sol. Molibdato de amonio al 16% en H₂SO₄ 1.0 N.
2. Reactivo de color: Preparar cada vez que se utilice. Mezclar 4 mL de molibdato de amonio al 16% en H₂SO₄ 10 N, 36 mL de agua desionizada y 2 g de FeSO₄·7H₂O.
3. Ácido tricloroacético (TCA) 0.5 N
4. Sol. patrón de KH₂PO₄ 1mM

Método

1. A la muestra que contiene hasta 0.7 μmoles de Pi, agregar TCA 0.5 N hasta que el volumen sea de 2 mL y mezclar.
2. Agregar 1 mL de reactivo de color y mezclar.
3. Preparar blanco de reactivo con 2 mL de TCA 0.5N y 1 mL de reactivo de color.
4. A los 10 min, leer la absorbancia a 660nm. El color es estable 30 min a temperatura ambiente.

- Muestra problema: Para el caso del medio PCG, tomar 1 ml del filtrado de células + 1 ml de TCA (0.5N) + 1 ml de reactivo de color y procesar igual que el punto 4.

Curva patrón (0-0.6 μ moles)

Reactivos (mL)	Tubos						
	1	2	3	4	5	6	7
Patrón de KH_2PO_4 1mM	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
Agua bidestilada	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4
TCA 0.5N	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Reactivo de color	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Cuantificación de nitratos: Método de Brucina-Ácido Sulfámico (APHA, AWWA, WPCF, 1992)

Reactivos:

- Sol. Madre de NO_3 1mg/L * (pesar 721.8 mg KNO_3 y aforar a 1 L agua desionizada)
- Sol. Patrón de KNO_3 0.01mg/L (Dilución 1:100 sol. Madre) * (1ml = 1 μ g NO_3)
- Sol. NaCl 30% (es necesario dejarla en agitación toda la noche para que la sal se disuelva completamente)
- Sol. H_2SO_4 (una dilución 1:1.25 del reactivo en hielo, es necesario hacerlo en cama de hielo, reacción altamente exérgica).
- Reactivo de Brucina-ácido Sulfámico *

*almacenar en refrigeración a 4°C

Curva Patrón y muestra problema:

Reactivos (mL)	Tubos						Problema
	1	2	3	4	5	6	
H ₂ O (desionizada)	3	2.8	2.6	2.4	2.2	2.0	---
KNO ₃ 0.01mg/L	---	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	---
NaCl	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Brucina	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Problema (diluir 1:30)	---	---	---	---	---	---	3.0
H ₂ SO ₄	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

1. Incubar tubos a 95°C en baño maría 20 min.
2. Enfriar a temperatura ambiente
3. Tomar lectura de absorbancia a 410 nm (calibrar el espectro con el tubo 1)

Determinación de NH₄⁺ (Método del fenato 132 C) (APHA, AWWA, WPCF, 1971)

Reactivos:

a. Ácido hipocloroso (hipoclorito): A 40 mL de agua destilada adicionar 10 mL de cloro (CLOROX) comercial al 5 %. Ajustar el pH de la mezcla a 6.5-7 con HCl concentrado. Este reactivo debe prepararse cada semana.

b. Sulfato Manganoso 0.003 M: Disolver 50 mg de MnSO₄ H₂O en 100 mL de agua destilada

c. Fenato: Disolver 2.5 g de NaOH y 10 g de fenol (C₆H₅OH) en 100 mL de agua desionizada. Este reactivo debe prepararse cada semana.

Stock de Amonio: Disolver 381.9 mg de cloruro de amonio anhidro (NH₄Cl), secado previamente en la estufa a 100 ° C y disolverlo en 1 L de agua desionizada

Estándar de amonio: Disolver 1.25 mL del stock de amonio en 250 mL de agua desionizada. Este reactivo debe prepararse cada semana.

Curva

$\mu\text{g NH}_3$	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	1.5	2	3	4	5
Volumen de la solución estándar	0.16	0.33	0.49	0.66	0.82	0.98	1.15	1.31	1.48	1.64	2.46	3.28	4.92	6.55	8.22
Volumen de agua desionizada	9.84	9.67	9.51	9.34	9.18	9.02	8.85	8.69	8.52	8.36	7.54	6.72	5.08	3.45	1.88

Procedimiento

- A un volumen de 10 mL adicionar los reactivos en el siguiente orden:

b- con 0.05 mL

a- con 0.5 mL

c-con 0.6 mL

- Mezclar con vortex después de la adición de cada uno de los reactivos
- Se observa una coloración azul después de 10 min y es estable 24 horas
- Leer la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm

Nota. El material a utilizar debe estar lavado con etanol, agua destilada y agua desionizada para evitar interferencias

ANEXO II

Técnica para la limpieza de las diatomeas con ácido nítrico (Rushforth *et al.*, 1984)

Procedimiento:

1. Colocar 2 mL de muestras en vasos de precipitado de 50 mL
2. Adicionar 20 mL de agua destilada y 10 mL de ácido nítrico
3. Calentar lentamente y se deja hervir la muestra hasta que disminuya el líquido a 20 mL evitando un calentamiento que provoque que la muestra se salpique
4. Adicionar aproximadamente 50 mg de dicromato de potasio y se hierve por 5 minutos más
5. La muestra se deja enfriar a temperatura ambiente y después se colocan 12 mL en tubos Falcón, se centrifugan por 10 min a 500 rpm
6. Se elimina el sobrenadante hasta un volumen de 2 mL con pipeta pasteur
7. Resuspender la muestra con agua destilada hasta un volumen de 12 mL
8. La centrifugación, la resuspensión y el decante se realiza seis veces; en el último lavado se llena hasta un volumen de 10 mL
9. Desechar el sobrenadante y en el último lavado se guardan 2 mL de la muestra para hacer las preparaciones
10. Tomar 200 μ L de los 2 mL, los cuales se colocan en el área central de un cubreobjetos de 18 mm diámetro y se dejan secar en una parrilla a 100 °C (cada muestra por triplicado)
11. Se monta el cubreobjetos sobre el portaobjetos, al cual previamente se le ha agregado unas gotas de Naphrax® (previamente disuelto en tolueno)

12. Calentar hasta que el Naphrax® hierva de 3 a 10 segundos, cuidando homogeneizar la muestra presionando el portaobjetos con pinzas
13. Dejar secar las preparaciones un día para su posterior observación al microscopio
14. El resto del sobrenadante se guarda en tubos eppendorf

Técnica para la limpieza de las diatomeas con Peróxido de hidrógeno (Rushforth *et al.*, 1984)

Procedimiento:

1. Colocar 2 mL de muestras en vasos de precipitado de 50 mL
2. Adicionar 20 mL de peróxido de hidrógeno y 10 mL de agua destilada
3. Calentar lentamente y se deja hervir la muestra hasta que se concentre el líquido a 20 mL
4. Adicionar 10 mL de HCl y dejar hervir hasta alcanzar nuevamente un volumen de 20 mL
5. La muestra se deja enfriar a temperatura ambiente y después se colocan 12 mL en tubos Falcón, se centrifuga por 10 min a 500 rpm
6. Eliminar el sobrenadante hasta un volumen de 2 mL con pipeta pasteur
7. Resuspender la muestra con agua destilada hasta un volumen de 12 mL
8. La centrifugación, la resuspensión y el decante se realiza seis veces; en el último lavado se llena hasta un volumen de 10 mL
9. Desechar el sobrenadante y en el último lavado sólo se guardan 2 mL de la muestra para hacer las preparaciones
10. Tomar 200 µL de los 2 mL, los cuales se colocan sobre toda el área central de un cubreobjetos de 18 mm diámetro y se secan en una parrilla a 100 °C (cada muestra por triplicado)

11. Se monta el cubreobjetos sobre el portaobjetos, al cual previamente se le ha agregado unas gotas de Naphrax® (previamente disuelto en tolueno)
12. Calentar hasta que el Naphrax® hierva de 3 a 10 segundos, cuidando homogeneizar la muestra presionando el portaobjetos con pinzas
13. Secar las preparaciones un día para su posterior observación al microscopio
14. El resto del sobrenadante se guarda en tubos eppendorf

Determinación de Actividad de Fosfatasa (Whitton *et al.*, 1999)

Los sustratos de fósforo orgánico utilizados son *para*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) y bis *para*-nitrofenil fosfato (bis-*p*NPP):

para-nitrofenil fosfato (*p*NPP) -----enzima fosfomonoesterasa (PMEasa)

bis para-nitrofenil fosfato (bis-*p*NPP) ----enzima fosfodiesterasa (PDEasa)

En ambas reacciones la actividad de las enzimas se mide mediante la producción de para nitrofenol (*p*NP) (Chróst y Krambeck, 1986).

Procedimiento:

1. Preparación del material

Todo el material empleado en estos ensayos se debe lavar previamente en el laboratorio con HCl al 10% y sumergirlo máximo 30 minutos en esta solución. Después se enjuagan 4 veces con agua destilada para eliminar cualquier resto de fósforo y HCl.

Para preparar el HCl al 10% se agregan 10 ml de HCl 1 N a 90 ml de agua destilada. El HCl al 10 % se puede reutilizar pero no más de 10 veces o antes de

que adquiriera un color amarillento. Es recomendable tener un almacén de material lavado con HCl al 10%: probetas, matraces Erlenmeyer, tubos, puntas de pipetas, vasos de precipitados, etc.

2. Preparación de reactivos (substratos y terminador).

Para-nitrofenil fosfato (pNPP), para la actividad PMEasa (enzima fosfomonoesterasa) a 50 μM de concentración final, se prepara una solución de 1,5 mM.

Stock de 3 mM = 0.1113 g pNPP disueltos en 100 ml de Medio Chu

Para el ensayo **1,5 mM** = tomar 50 ml del stock de 3 mM + 50 ml de Medio Chu

Bis-para-nitrofenil fosfato (bis-pNPP), para medir la actividad PDEasa (enzima fosfodiesterasa) a 50 μM de concentración final, se preparan alícuotas con una concentración de 1,5 mM.

Stock de 3 mM = 0.1087 g bis-pNPP disueltos en 100 ml de Medio Chu. Para el ensayo **1,5 mM** = tomar 50 ml del stock de 3 mM + 50 ml de Medio Chu

Se toman de 2 a 3 alícuotas de 5 ml por sustrato, se colocan en tubos Falcón tapados con papel aluminio y se mantienen congeladas hasta el momento del experimento. Los tubos se marcan con la concentración final y el nombre del sustrato.

Nota: El medio de ensayo que se ocupa en la elaboración de los substratos es sin estabilizador de pH (HEPES) ni ajuste de pH.

Solución terminadora (Terminador B)

La solución para detener la reacción enzimática de la fosfatasa o terminador B, se prepara lo más cercano al momento de salir al campo, se guarda en tubos de Falcón de 10 ml cubiertos con papel aluminio y rotulados. Los tubos se mantienen

a 4 °C hasta el momento de su uso. La solución terminadora se prepara con 3 reactivos disueltos en 100 ml de H₂O destilada, los cuales deben agregarse en el orden de la Tabla 23 para evitar que precipiten:

Tabla 23. Compuestos requeridos para preparar la solución terminadora

Compuesto	Cantidad (g)	Concentración final por tubo
NaOH	4.4	100 mM
EDTA	1.023	2.5mM
K ₂ HPO ₄	9.57	50 mM

Después de preparar el terminador verificar que el pH se encuentre alrededor de 11.6-11.8. El terminador detiene la actividad enzimática de las fosfatasa al aumentar el pH. Un pH mayor a 12 puede producir la hidrólisis del sustrato pNPP (*Para*-nitrofenil fosfato).

3. Ensayo de la actividad fosfatasa

El ensayo consiste en medir la actividad de las enzimas fosfatasa a partir de la producción de pNP (*para*-nitrofenol) por las enzimas fosfomonoesterasa (PMEasa) y fosfodiesterasa (PDEasa). La duración del experimento es de 30 min, tiempo que empieza a contar después de haber añadido la muestra biológica al primer vial. La absorbancia del pNP se mide con el espectrofotómetro a la longitud de onda de 405 nm y su concentración se calcula en el laboratorio a partir de la curva de calibración de pNP. Los datos se expresan como $\mu\text{mol pNP liberados mg}^{-1} \text{ clorofila a h}^{-1}$.

El volumen de cada réplica para medir la absorbancia estará en función de la capacidad de los viales del espectro, por lo que es importante mantener la concentración de los sustratos y el terminador.

4. Ensayo de pNPP a 50 μM concentración final

Antes de iniciar el ensayo es muy importante marcar bien todo: viales del ensayo, viales eppendorf con las muestras biológicas, tubos para el filtrado, etc. Se preparan 6 viales por cada muestra (4 réplicas mínimo, un blanco, un control). El volumen final de todos los viales es 15 ml. Cada réplica lleva medio de ensayo (ME), sustrato (S) y muestra biológica (MB)

El **Control** (C) lleva ME + MB, se utiliza para eliminar de la lectura la producción natural de *para*-nitrofenol (pNP) llevado a cabo por parte de la cianobacteria.

El **Blanco** (B) lleva ME+ S pero no MB, sirve para ajustar los resultados y eliminar la posible degradación del sustrato durante el tiempo del ensayo. El terminador y el sustrato deben estar descongelados antes de agregarlos a cada vial.

Actividad de fosfatasa (Contenido y volumen (mL) de cada vial).

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Blanco	Control
Medio CHU10	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5	15
Sustrato [1,5 mM]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	NO
Material Biológico	SI	SI	SI	SI	NO	SI
Terminador	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25

NOTA: Es importante recordar que se debe preparar un lote de viales donde el sustrato a agregar es el pNPP y otro lote para el bis-pNPP. El terminador se agrega después de que han transcurrido los 30 min necesarios para detener las reacciones enzimáticas de las fosfatasas.

REACTIVO SALKOWSKI (Departamento de Edafología del Colegio de Posgraduados)

Para preparar 100 mL mezclar:

- 35 mL de ácido perclórico

- 2 mL de FeCl_3
- 63 mL de H_2O destilada