

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE MEZCLA GASEOSA COMBUSTIBLE CON POTENCIAL ENERGÉTICO EMPLEANDO UN FOTOBIORREACTOR ANAEROBIO AUTOMATIZADO (FBR/A-a)

Tesis presentada por los bachilleres:

Ancco Mamani, Midwar Roly

Tejada Meza, Kevin

Para optar el Título Profesional de
Ingeniero Biotecnólogo.

Asesor: Dr. Roque Rodríguez, Francisco Javier

AREQUIPA - PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000025995

N° Trámite en Fac. 342-2017

Fecha Recep. Fac. 01-06-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **ANCCO MAMANI, Midwar Roly**
TEJADA MEZA, Kevin


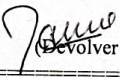
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"DISEÑO Y CONSTRUCCION DE SISTEMAS PARA LA BIOPRODUCCION DE ECOGAS COMBUSTIBLE EMPLEANDO Rhodobacter sp."

DICTAMINADORES: 1) **Dr. Gonzalo Dávila del Carpio** 2) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **"DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN SISTEMA PARA LA PRODUCCION BIOLOGICA DE GAS COMBUSTIBLE EMPLEANDO Rhodobacter sp"** después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS:   (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 04/07/2017

ASESOR: **Ing. Francisco Roque Rodríguez**

DICTAMEN ASESORÍA:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"PRODUCCION BIOLOGICA DE MEZCLA GASEOSA COMBUSTIBLE CON POTENCIAL ENERGETICO EMPLEANDO UN FOTOBIOREACTOR ANEROBIO AUTOMATIZADO (FBRA/A-a)"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente

FIRMA  FECHA 28/06/2018

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. Gonzalo Dávila del Carpio** 3) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**
2) **Dr. Fredy Molina Rodríguez**

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA   (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 09/07/2018

JURADOS: PRESIDENTE **DR. GONZALO DAVILA DEL CARPIO**
VOCAL **DR. FREDY MOLINA RODRIGUEZ**
SECRETARIO **Mgter. JAIME BARREDA DEL CARPIO**

FECHA 18/07/18 HORA 18.00 LOCAL SUN C-402

FIRMA DEL DECANO  FECHA 20/07/18

DEDICATORIA

A mis padres Jorge y Karin, por su apoyo e invaluable enseñanzas que me ofrecieron y ofrecerán durante toda mi vida, a mi hermano José Miguel y a mis abuelos por su paciencia y cariño.

Kevin

A mis padres Rodolfo y Sara, a mi hermano Leonel por ser los pilares de mi vida, que gracias a su apoyo incondicional y su gran ejemplo es que puedo continuar con mi desarrollo profesional.

Midwar

AGRADECIMIENTO

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María por subvencionar económicamente el proyecto con el cual se pudo generar la presente tesis.

A Nadia Gamero Begazo por su gran colaboración, apoyo y orientación, desde el inicio al fin de este proyecto.

A la Dra. Mónica Santamaría y todo el cuerpo profesional del Laboratorio de Análisis Moleculares BIOAL, por su enorme apoyo en el área de biología molecular y bioinformática.

A Jonathan del Villar, Diego Valdivia y Luis Lizárraga de la empresa Mad Wave Devices, por su vital apoyo en la automatización y diseño de software.

A la Sra. Luisa del Carpio y Norma Figueroa, por su amabilidad y apoyo incondicional durante la ejecución de la etapa experimental de la presente tesis.

Al Dr. Gonzalo Dávila del Carpio, Dr. Fredy Molina Rodríguez y al Mgter. Jaime Barreda del Carpio por su tiempo y recomendaciones brindadas para culminar con éxito el desarrollo de la presente tesis.

Al Dr. Francisco Javier Roque Rodríguez por su imponente labor como asesor de este trabajo y a la vez por el buen ejemplo, guía y motivación ofrecida durante los últimos años.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	XVI
ABSTRACT	XVIII
INTRODUCCIÓN	XX
OBJETIVOS	XXII
Objetivo General.....	XXII
Objetivos Específicos	XXII
HIPÓTESIS	XXIII
VARIABLES	XXIII
Variables independientes.....	XXIII
Variables dependientes.....	XXIII
1. CAPÍTULO I.....	1
1.1 Combustión y mezclas gaseosas combustibles	1
1.2 Especies bacterianas con capacidad productora de mezcla gaseosa combustible.....	6
1.3 Biocombustibles gaseosos	8
1.4 Producción biológica de mezcla gaseosa combustible.....	10
1.4.1 Biogás.....	10
1.4.2 Biometano	14
1.4.3 Biohidrógeno.....	16
1.4.4 Hitano o Hythane	23

1.5	Biorreactores para la producción de mezcla gaseosa combustible.....	25
1.5.1	Fotobiorreactores (FBR)	26
1.6	Perspectivas futuras	29
2.	CAPÍTULO II.....	31
2.1	Lugar de ejecución	31
2.2	Materiales	31
2.2.1	Material biológico	31
2.2.2	Equipos.....	31
2.2.3	Reactivos	32
2.2.4	Material de vidrio	33
2.2.5	Otros	34
2.3	Métodos	35
2.4	Diagrama de flujo de actividades	48
3.	CAPÍTULO III	49
3.1	Aislamiento y selección de bacterias nativas de lodos y fangos de cuerpos de aguas superficiales estancadas con potencial de generación de mezcla de gases combustible.....	49
3.1.1	Recolección de muestras y aislamiento de bacterias nativas	49
3.1.2	Selección de bacterias nativas con potencial de producción de mezcla gaseosa combustible.....	57
3.2	Identificación y secuenciación de especies bacterianas seleccionadas con capacidad de producción de mezcla gaseosa combustible.	60

3.3	Determinación de parámetros de crecimiento bacteriano y de producción de mezcla gaseosa combustible.	63
3.3.1	Parámetros cinéticos de crecimiento microbiano	63
3.3.2	Parámetros cinéticos de producción de mezcla gaseosa combustible.....	64
3.4	Diseño, construcción y configuración experimental del (FBR/A-a) con parámetros óptimos para la producción biológica de mezcla gaseosa combustible.64	
3.4.1	Evaluación del FBR/A-a para la producción biológica de mezcla gaseosa combustible.....	83
	CONCLUSIONES	96
	RECOMENDACIONES.....	97
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
	ANEXOS	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de energía a nivel mundial en Millones de toneladas.	3
Figura 2. Etapas de la producción de biogás.	12
Figura 3. Principales métodos biológicos para la obtención de H ₂	16
Figura 4. Esquema general de la Fermentación Oscura.	18
Figura 5. Esquema general del proceso de Biofotólisis Directa.	19
Figura 6. Esquema general del proceso de dos etapas de Biofotólisis Indirecta.	20
Figura 7. Esquema general de la Fotofermentación.	22
Figura 8. Esquema de producción biológica de Hitano por DA en dos etapas.....	24
Figura 9. Esquema de plan de muestreo.	35
Figura 10. Esquema del módulo de experimentación.....	39
Figura 11. Esquema de disposición de puertos, Headplate ss.	43
Figura 12. Esquema estructural del FBR/A-a.....	46
Figura 13. Diagrama de flujo de métodos y actividades.	48
Figura 14. Imagen satelital con los puntos de muestreo establecidos.	50
Figura 15. Colonia rojiza en el fondo del tubo de cultivo.	52
Figura 16. Apariencia de las bacterias, sin presencia de microalgas verdes en medio líquido	53
Figura 17. Apariencia macroscópica de la cepa P-11.....	54
Figura 18. Apariencia macroscópica de la cepa P-12.....	54
Figura 19. Apariencia macroscópica de la cepa P-13.....	55
Figura 20. Tinción de Gram de la cepa P-11 al microscopio óptico (100x).....	55
Figura 21. Tinción de Gram de la cepa P-12 al microscopio óptico (100x).....	56
Figura 22. Tinción de Gram de la cepa P-13 al microscopio óptico (100x).....	56

Figura 23. Tubo de cultivo con la cepa P-13	58
Figura 24. Apariencia macroscópica de la cepa P-13 cultivo en placa en condiciones anaeróbicas.	59
Figura 25. Resultado de BLAST.	61
Figura 26. Arbol filogenético de la cepa P-13 (Query)	62
Figura 27 Regresión lineal para curva de peso seco bacteriano	63
Figura 28. Cinética de crecimiento microbiano.....	64
Figura 29. Modelo de Gompertz para producción de gas.....	68
Figura 30. Plano bidimensional del agitador magnético	70
Figura 31. Planos tridimensionales del agitador magnético	72
Figura 32. Diseño 2D de Vessel.	73
Figura 33. Diseño 2D de la Chaqueta.....	73
Figura 34. Diseño 3D del Vessel y Chaqueta.....	74
Figura 35. Planos bidimensionales del headplate ss.....	75
Figura 36. Plano tridimensional del headplate ss.	76
Figura 37. Planos bidimensionales de la fuente de luz.....	77
Figura 38. Planos tridimensionales de la fuente de luz.	78
Figura 39. Esquema de funcionamiento del Sistema de control automático.....	80
Figura 40. Esquema de configuración final.....	81
Figura 41. Configuración final en 3D.....	82
Figura 42. Fotografía del FBR/A-a con accesorios y periféricos.....	83
Figura 43. Perfil de pH.	84
Figura 44. Perfil de temperatura.	85
Figura 45. Perfil de ORP.	86

Figura 46. Perfil de oxígeno disuelto.....	87
Figura 47. Perfil de intensidad luminosa	88
Figura 48. Perfil de velocidad de agitación.	89
Figura 49. Apariencia final de la cepa en el FBR/A-a.....	90
Figura 50. Composición del gas registrado en el analizador de gases Biogas 5000 ..	93
Figura 51. Analizador de gas y muestra.	94
Figura 52. Gasómetro acumulador de mezcla gaseosa combustible obtenida.....	95
Figura 53. Cultivo de muestras en medio líquido.....	111
Figura 54. Tubos de cultivo en cámara de fotoperiodo.	112
Figura 55. Cultivo en medio sólido.	113
Figura 56. Cámara para cultivo libre de oxígeno.	114
Figura 57. Módulo de experimentación hexacompartimentalizado.	115
Figura 58. Resultado de BLAST.	116
Figura 59. Árbol filogenético basado en secuencias del gen ARNr 16S que muestra la posición filogenética de la cepa P-13 (Query).....	117
Figura 60. Sensores, pH, Oxígeno disuelto y Potencial de óxido-reducción.	118
Figura 61. Analizador de gases, Geotech – Biogas 5000	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies microbianas con capacidad productora de gases combustibles.	7
Tabla 2. Composición de principales mezclas gaseosas de origen biológico utilizadas como combustible.	25
Tabla 3. Condiciones experimentales para la selección de cepas con capacidad de producción de mezclas de gases combustible.	38
Tabla 4. Codificación de los puertos, funciones y/o usos.	44
Tabla 5. Elementos del FBR/A-a descritos a detalle.	45
Tabla 6. Parámetros constantes durante la evaluación.	47
Tabla 7. Detalles de los puntos de muestreo establecidos.	49
Tabla 8. Desarrollo de bacterias nativas según su fuente de recolección.	51
Tabla 9. Detalles del cultivo en tubo por punción.	57
Tabla 10. Capacidad de producción de gas con diferentes concentraciones de sustrato y tipo de luz.	65
Tabla 11. Composición de gas obtenido.	91
Tabla 12. Absorbancia y su peso seco bacteriano.	120
Tabla 13. Concentración de biomasa datos observados y calculados.	121
Tabla 14. Producción de mezcla gaseosa con diferentes concentraciones de sustrato y tipo de luz, ajustados de acuerdo a Modelo Gompertz.	122

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	111
ANEXO 2	115
ANEXO 3	118
ANEXO 4	120



LISTA DE ABREVIATURAS

Abs: Absorbancia.

ATCC: American Type Culture Collection.

ATP: adenosín trifosfato.

BPNS: Bacterias purpuras no sulfurosas.

COV: Compuestos orgánicos volátiles.

CSTR: Reactores de tanque de agitación continúa.

DA: Digestión anaerobia.

DQO: Demanda química de oxígeno.

DSMZ: *Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen.*

FBR/A-a: Fotobiorreactor anaerobio automatizado.

FBR: Fotobiorreactor.

GLP: Gas Licuado de Petróleo.

GNS: Gas natural sintético.

GTO: Trioleato de glicerol.

HCI: Hydrogen Component Inc.

HMI: Human Machine Interface.

LED: *light emitting diode* (diodo emisor de luz)

MCI: Motores de combustión interna.

m.s.n.m: Metros sobre el nivel del mar.

OD: Oxígeno disuelto.

ORP: Potencial oxido reducción.

PID: Proporcional integral y derivativo.

PM: Material particulado.

PSA: Pressure Swing Adsorption (Adsorción por variación de presión).

PWM: Pulse with modulation (Modulación por ancho de pulsos).

RPM: Revoluciones por minuto.

SC: Sistema de control.

UTM: Universal Transverse Mercator

USB: Universal serial bus

X: biomasa microbiana.

X₀: biomasa microbiana inicial.

X_m: biomasa microbiana máxima.

β_{max}: tasa de crecimiento específica

t: tiempo.

Y: acumulación específica de producción de mezcla gaseosa combustible.

A: Potencial de producción de gas

μ_{\max} : tasa máxima de producción de gas

λ : periodo de fase de latencia.

e: constante matemática (2,718282).





RESUMEN

La presente investigación tuvo como propósito producir biológicamente una mezcla gaseosa combustible con características potenciales para su aplicación en el sector energético, utilizando un fotobiorreactor anaerobio automatizado (FBR/A-a) el cual fue diseñado, construido y evaluado de acuerdo a los estudios previos realizados a la cepa bacteriana. La investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María y fue financiada en su totalidad por fondos internos concursables del Vicerrectorado de Investigación. El estudio es de tipo descriptivo, con enfoque cuantitativo y de diseño experimental longitudinal, este inició con el aislamiento e identificación molecular del microorganismo nativo con capacidad de producir una mezcla gaseosa combustible presente en lodos de aguas estancadas utilizando medios de cultivo sintéticos, luego se realizaron estudios de parámetros cinéticos de crecimiento bacteriano y producción de gas empleando el modelo Logístico y Gompertz respectivamente, posteriormente se realizó el diseño y construcción de un FBR/A-a en el cual se llevó a cabo la evaluación de producción de la mezcla gaseosa combustible y desarrollo de biomasa, finalmente para culminar se caracterizó el gas obtenido. Se pudo identificar una cepa bacteriana con capacidad de producir gas, con tasa máxima microbiana de $0,044 \text{ h}^{-1}$ y tasa máxima de producción de gas de $0,087 \text{ h}^{-1}$, estos parámetros cinéticos son contrastables con diferentes tipos de microorganismo productores de mezcla gaseosa combustible, el FBR/A-a construido permitió obtener

datos en tiempo real y evaluar el comportamiento de pH, oxígeno disuelto, ORP, temperatura, intensidad luminosa y velocidad de agitación en el proceso de producción de gas, la mezcla gaseosa obtenida tras un periodo de 292 horas, estuvo conformada en promedio de 32,92% de metano, 5,4% de dióxido de carbono, 13,46% de oxígeno, 29,6 ppm de ácido sulfhídrico y 47,24% de otros gases. Finalmente se puede precisar que la cepa bacteriana tiene la capacidad de generar mezcla gaseosa combustible, que debido a su composición a comparación con otros gases como el biogás resulta ser atractiva para desarrollar más investigaciones que permitan emplearla como una fuente energética limpia.

Palabras clave: Cepa bacteriana, fotobiorreactor anaerobio, parámetros cinéticos, mezcla gaseosa combustible.





ABSTRACT

The purpose of this research was to produce biologically a combustible gas mixture with potential characteristics for its application in the energy sector, using an automated anaerobic photobioreactor which was designed, constructed and evaluated according to previous studies carried out at the bacterial strain. The research was carried out in the facilities of the Universidad Católica de Santa María and was financed in its entirety by internal competitive funds from the Vice-Rectorate for Research. The study is of a descriptive type, with a quantitative approach and longitudinal experimental design, this began with the isolation and molecular identification of the native microorganism with the capacity to produce a combustible gas mixture present in sludge from stagnant waters using synthetic culture media, then studies of kinetic parameters of bacterial growth and gas production using the Logistic and Gompertz model respectively, afterwards the design and construction of an automated anaerobic photobioreactor was carried out in which the production evaluation of the fuel gas mixture and development of biomass, finally to culminate, the gas obtained was characterized. It was possible to identify a bacterial strain capable of producing gas, with maximum microbial rate of 0,044 h⁻¹ and maximum gas production rate of 0,087 h⁻¹, these kinetic parameters are testable with different types of microorganisms producing

fuel gas mixture, the constructed automated anaerobic photobioreactor allowed obtaining real-time data and evaluating the behavior of pH, dissolved oxygen, ORP, temperature, light intensity and agitation speed in the gas production process, the gaseous mixture obtained after a period of 292 hours, It was made up of an average of 32,92% methane, 5,4% carbon dioxide, 13,46% oxygen, 29,6 ppm hydrogen sulphide and 47,24% other gases. Finally, can be specified that the bacterial strain has the capacity to generate a combustible gas mixture, which due to its composition compared to other gases such as biogas, turns out to be attractive to develop more research that allows it to be used as a clean energy source

Keywords: Bacterial strain, anaerobic photobioreactor, kinetic parameters, combustible gas mixture.

