

# UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

## Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

### Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica



***“DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y FUNCIONAMIENTO DE UN SISTEMA FOTOBIOREACCIONANTE PARA EL CONSUMO DE CO<sub>2</sub> CON *Scenedesmus quadricauda* COMO AGENTE BIODEPURANTE”***

***Tesis presentada por el Bachiller:  
Adrián Percy Deza Dávalos***

***Para optar el título profesional de:  
INGENIERO BIOTECNÓLOGO***

**AREQUIPA – PERÚ**

**2012**

## INDICE

DEDICATORIA	I	
AGRADECIMIENTO	II	
RESUMEN	III	
ABSTRACT	IV	
Cap. I	Introducción	1
1.1.	Objetivos	3
1.2.	Hipótesis	4
1.3.	Variables e indicadores	5
Cap. II	Marco teórico	
2.1.	Calentamiento global	6
2.2.	Cambio climático en el Perú	6
2.3.	Situación climática en la región Arequipa	8
2.4.	Gases de efecto invernadero	9
2.5.	Papel del CO <sub>2</sub> en la atmósfera	10
2.6.	Fotosíntesis (captura y fijación de CO <sub>2</sub> )	11
2.7.	Métodos de mitigación de la concentración de CO <sub>2</sub>	15
2.8.	Características generales de las microalgas	16
2.9.	Crecimiento de las algas	20
2.10.	Sistemas de producción de microalgas	23
2.11.	Usos y aplicaciones de las microalgas	30
2.12.	Genero <i>Scenedesmus</i>	32
2.13.	Características de los fotobioreactores	33

2.14.	Fotobioreactores utilizados en la fijación de CO <sub>2</sub>	34
2.15.	Métodos para determinar el consumo de CO <sub>2</sub>	37
2.16.	Perspectivas futuras	40
Cap.III	Materiales y métodos	
3.1.	Lugar de ejecución	41
3.2.	Materiales	41
3.3.	Métodos	43
3.4.	Flujograma de actividades	52
3.5.	Análisis estadístico	53
Cap.IV	Resultados y Discusión	
4.1.	Pre cultivo y propagación de <i>Scenedesmus quadricauda</i>	54
4.2.	Condiciones finales de diseño y construcción de FBR	55
4.3.	Acondicionamiento experimental del FBR	60
4.4.	Condiciones del desarrollo de <i>S. quadricauda</i> en el FBR	66
4.5.	Consumo de CO <sub>2</sub>	71
4.6.	Análisis estadístico	78
	Conclusiones	80
	Sugerencias	81
	Bibliografía	82
	Anexos	88

## Índice de figuras

<b>Fig.1.</b>	Contribución de los gases que producen el efecto invernadero al calentamiento del planeta en los últimos 10 años.	<b>7</b>
<b>Fig.2.</b>	Concentración atmosférica del CO <sub>2</sub> y proyecciones al 2015.	<b>10</b>
<b>Fig.3.</b>	Reacciones luminosa y oscura en la fotosíntesis.	<b>12</b>
<b>Fig.4.</b>	Transporte del CO <sub>2</sub> desde la formación de la burbuja de gas CO <sub>2</sub> hasta el interior de las células microalgales	<b>14</b>
<b>Fig.5.</b>	Transporte del CO <sub>2</sub> y HCO <sub>3</sub> al interior de las células.	<b>14</b>
<b>Fig.6.</b>	Ciclo de Calvin.	<b>15</b>
<b>Fig.7.</b>	Curva de crecimiento típica de un cultivo de algas.	<b>23</b>
<b>Fig.8.</b>	Diferentes usos de las microalgas hoy en día.	<b>31</b>
<b>Fig.9.</b>	Estructura morfológica del género <i>Scenedesmus</i> .	<b>32</b>
<b>Fig.10.</b>	<i>Scenedesmus sp.</i>	<b>33</b>
<b>Fig.11.</b>	Fotobioreactores de columna de burbujas.	<b>35</b>
<b>Fig.12.</b>	Fotobioreactores tipo Airlif.	<b>36</b>
<b>Fig.13.</b>	Analizador de CO <sub>2</sub> : VAISALA, modelo MI70, utilizado para medir las concentraciones de CO <sub>2</sub> .	<b>39</b>
<b>Fig.14.</b>	Analizador de CO <sub>2</sub> : LANA SARRATE, modelo Khane 900 Plus.	<b>40</b>
<b>Fig.15.</b>	Esquema del sistema de distribución de CO <sub>2</sub> del FBR.	<b>46</b>
<b>Fig.16.</b>	Esquema de perfil del sistema de soporte de los tubos del FBR.	<b>47</b>
<b>Fig.17.</b>	Masificación del pre-inóculo de la microalga <i>S. quadricauda</i> en el FBR.	<b>54</b>
<b>Fig.18.</b>	Esquema del escalamiento del cultivo de <i>S. quadricauda</i>	<b>55</b>
<b>Fig.19.</b>	Diseño y medidas de cada uno de los tubos fotobioreactores.	<b>57</b>
<b>Fig.20.</b>	Vistas en perfil (A) y frontal (B) del diseño final del sistema FBR.	<b>58</b>
<b>Fig.21.</b>	Sistema de soporte de los tubos.	<b>58</b>
<b>Fig.22.</b>	Fotografías del sistema de soporte de los tubos.	<b>59</b>

<b>Fig.23.</b>	Fotografías de la parte inferior del FBR.	<b>60</b>
<b>Fig.24.</b>	Fotografía del funcionamiento del FBR.	<b>62</b>
<b>Fig.25.</b>	Comparación y seguimiento de la variación de la temperatura y pH del cultivo de 9 días de <i>S.quadricauda</i>	<b>63</b>
<b>Fig.26.</b>	Variación del pH y temperatura del cultivo de 24 horas de <i>Scenedesmus quadricauda</i> en el FBR.	<b>64</b>
<b>Fig.27.</b>	Comparación de la variación del ingreso de 3 flujos de CO <sub>2</sub> para el lapso de 24 horas .	<b>66</b>
<b>Fig.28.</b>	Fotografías del resultado de la observación al microscópio a 10X y 40X del desarrollo microalgal de la cepa <i>S.quadricauda</i>	<b>67</b>
<b>Fig.29.</b>	Condiciones iniciales del cultivo <i>S.quadricauda</i> en el FBR .	<b>68</b>
<b>Fig.30.</b>	Crecimiento y desarrollo de <i>S.quadricauda</i>	<b>69</b>
<b>Fig.31.</b>	Condiciones finales y resultado del crecimiento de <i>S.quadricauda</i>	<b>69</b>
<b>Fig.32.</b>	Preparación y observación al microscopio.	<b>70</b>
<b>Fig.33.</b>	Conteo de <i>S.quadricauda</i> en cámara de Neubauer.	<b>70</b>
<b>Fig.34.</b>	Curva de crecimiento de biomasa de <i>S.quadricauda</i>	<b>73</b>
<b>Fig.35.</b>	Curva de crecimiento de <i>S.quadricauda</i> control.	<b>74</b>
<b>Fig.36.</b>	Titulación de la muestra con NaOH.	<b>76</b>
<b>Fig.37.</b>	Resultado del consumo de CO <sub>2</sub> de <i>S.quadricauda</i> para el tratamiento con CO <sub>2</sub> expresado en moles CO <sub>2</sub> /L.	<b>76</b>
<b>Fig.38.</b>	Resultado del consumo de CO <sub>2</sub> de <i>S.quadricauda</i> para el tratamiento sin CO <sub>2</sub> expresado en moles CO <sub>2</sub> /L.	<b>77</b>
<b>Fig.39.</b>	Cuadro comparativo de la eficiencia en la determinación del consumo de CO <sub>2</sub> de <i>S.quadricauda</i> expresados en moles CO <sub>2</sub> /L.	<b>77</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Variables e indicadores.	<b>5</b>
<b>Tabla 2.</b>	Clasificación de las microalgas.	<b>17</b>
<b>Tabla 3.</b>	Tolerancia al CO <sub>2</sub> de varias especies.	<b>19</b>
<b>Tabla 4.</b>	Microalgas utilizadas en la fijación de CO <sub>2</sub> .	<b>30</b>
<b>Tabla 5.</b>	Niveles de cultivo de microalgas en laboratorio.	<b>44</b>
<b>Tabla 6.</b>	Parámetros de diseño del sistema FBR	<b>49</b>
<b>Tabla 7.</b>	Efecto de la regulación del pH CO <sub>2</sub> alimentado al sistema FBR	<b>61</b>
<b>Tabla 8.</b>	Comparación del desarrollo de <i>S.quadricauda</i> en sombra al 35% y sin sombra expuesto directamente a los rayos solares.	<b>65</b>
<b>Tabla 9.</b>	Parámetros de operación en el FBR	<b>71</b>
<b>Tabla 10.</b>	Comparación de la biomasa de la microalga en el fotobioreactor con y sin suministro de CO <sub>2</sub>	<b>78</b>
<b>Tabla 11.</b>	Comparación del consumo de CO <sub>2</sub> en el fotobioreactor con y sin suministro de CO <sub>2</sub>	<b>79</b>
<b>Tabla 12.</b>	Composición del medio de cultivo Guillard.	<b>88</b>
<b>Tabla 13.</b>	Variación en días de pH y temperatura del cultivo microalgal	<b>89</b>
<b>Tabla 14.</b>	Variación diaria de pH y temperatura del cultivo <i>S.quadricauda</i>	<b>90</b>
<b>Tabla 15.</b>	Comparación entre promedio de la densidad para ambos tratamientos de <i>Scenedesmus</i>	<b>90</b>
<b>Tabla 16.</b>	Valores para la curva de crecimiento	<b>91</b>
<b>Tabla 17.</b>	Curva de crecimiento en el sistema FBR sin alimentación con CO <sub>2</sub>	<b>92</b>
<b>Tabla 18.</b>	Determinación de la captura de CO <sub>2</sub> con CO <sub>2</sub> en el sistema FBR.	<b>92</b>
<b>Tabla 19.</b>	Determinación de la captura de CO <sub>2</sub> de <i>S.quadricauda</i> sin CO <sub>2</sub> en el sistema FBR.	<b>93</b>

## Índice de ecuaciones

<b>Ec. 1.</b>	Reacción de $\text{CO}_2$ y agua en la fotosíntesis	<b>29</b>
<b>Ec. 2.</b>	Fórmula para el conteo de células en la cámara de Neubauer	<b>50</b>
<b>Ec. 3.</b>	Equilibrio carbónico en el consumo de $\text{CO}_2$	<b>50</b>
<b>Ec. 4.</b>	Escalamiento en relación a la altura del FBR	<b>55</b>
<b>Ec. 5.</b>	Fórmula para Capacidad volumétrica total del FBR	<b>56</b>
<b>Ec. 6.</b>	Fórmula para Capacidad volumétrica de cada tubo FBR	<b>56</b>
<b>Ec. 7.</b>	La reacción de $\text{CO}_2$ con NaOH para la captura de $\text{CO}_2$ en el FBR	<b>75</b>
<b>Ec. 8.</b>	Cálculo de la concentración de $\text{CO}_2$	<b>75</b>

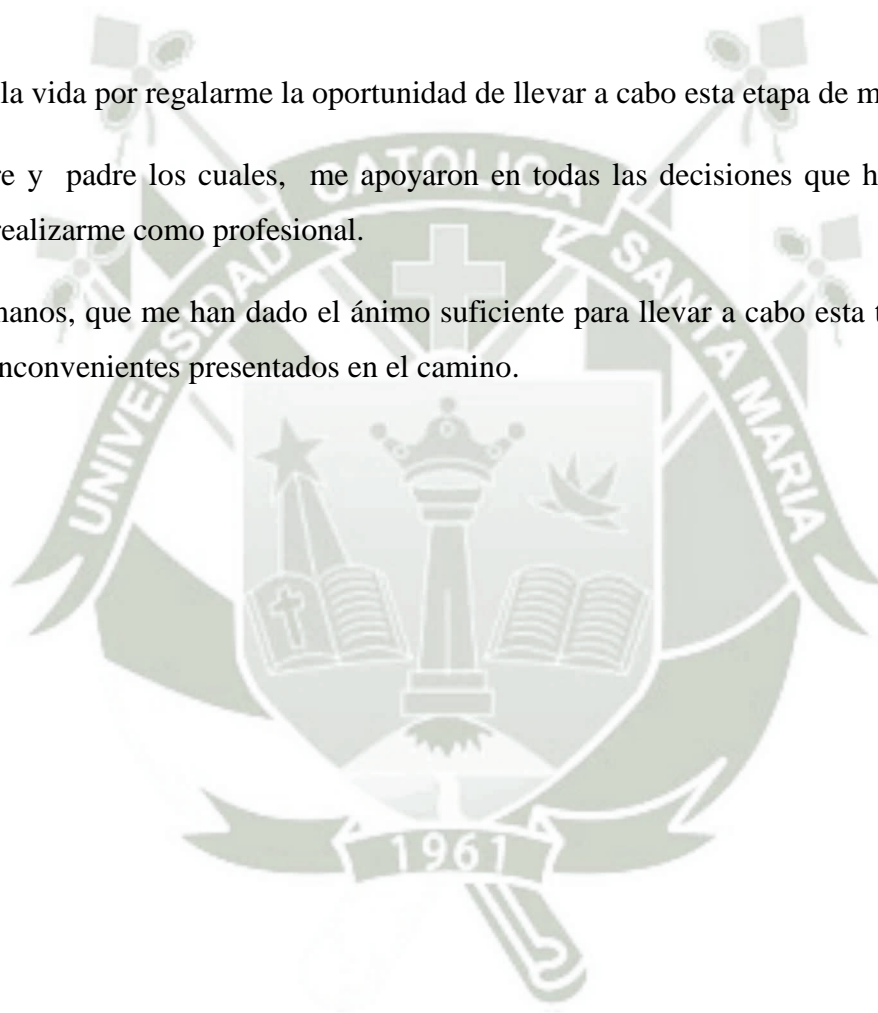


## DEDICATORIAS

A Dios y a la vida por regalarme la oportunidad de llevar a cabo esta etapa de mi vida.

A mi madre y padre los cuales, me apoyaron en todas las decisiones que he tomado, entre ellas la de realizarme como profesional.

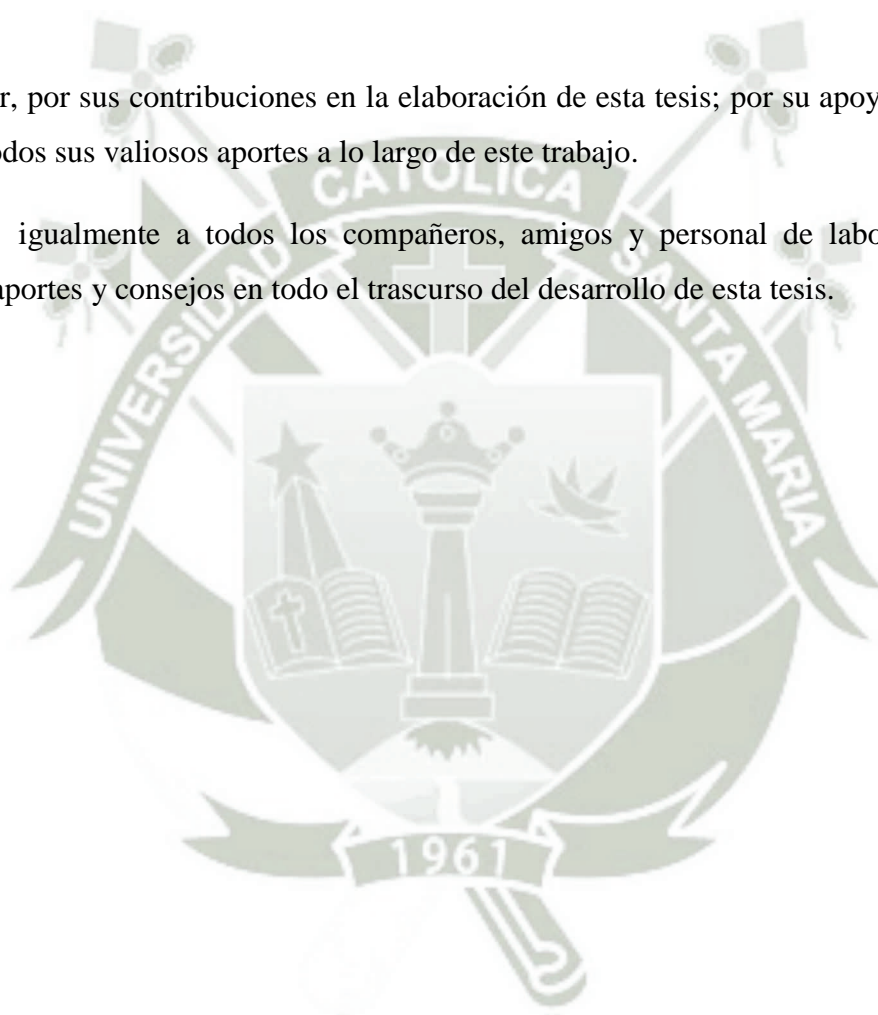
A mis hermanos, que me han dado el ánimo suficiente para llevar a cabo esta tarea, pese a los diferentes inconvenientes presentados en el camino.



## AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, por sus contribuciones en la elaboración de esta tesis; por su apoyo y orientación, así como todos sus valiosos aportes a lo largo de este trabajo.

Agradecer igualmente a todos los compañeros, amigos y personal de laboratorio por sus generosos aportes y consejos en todo el trascurso del desarrollo de esta tesis.



## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo diseñar, construir y acondicionar un sistema Fotobioreactor a escala de laboratorio para albergar y multiplicar la especie microalgal *Scenedesmus quadricauda*, además que sea capaz de consumir CO<sub>2</sub> a partir de un balón de gas de CO<sub>2</sub> como fuente originaria. Para su diseño, se tomaron parámetros como número de tubos, que fueron 5 en total; material y grado de transparencia de los tubos que fueron de policarbonato y totalmente transparentes; ángulo de inclinación de los tubos de 45 a 90 grados; cada tubo estuvo equipado con un sistema de mangueras para el transporte de CO<sub>2</sub> con una llave para la cosecha y/o toma de muestra; un sistema de soporte, el cual proporcionó estabilidad al FBR y estuvo conformado por un armazón de fierro con sujetadores en los extremos para soportar y contener a los tubos. Para la construcción del sistema Fotobioreactor, se consideraron variables como volumen del fotobioreactor, con una capacidad total de 17,5L; una altura final de 59,5 cm y un diámetro de 9,5 cm para cada uno de los tubos. En la fase de funcionamiento, se acondicionó el sistema para el óptimo funcionamiento del mismo, regulando variables como intensidad luminosa a través de la colocación de una malla Raschell, que variaron de 158000 Lux con luz directa a 51200 Lux con sombra al 35 %; temperatura promedio de 19 °C, pH de 7,14 a 8,2; CO<sub>2</sub> al 2% de velocidad de flujo y agitación constante; se trabajó con un volumen final de 3,5L (por cada tubo), una carga inicial de *Scenedesmus quadricauda* de  $4,5000 \cdot 10^6$  células/mL en un período de nueve días.

Finalmente, la alimentación con CO<sub>2</sub> dio buenos resultados obteniéndose un consumo final de 0,027 moles CO<sub>2</sub>/L y en constante crecimiento en comparación con la ausencia del mismo con apenas 0,014 moles CO<sub>2</sub>/L en su pico máximo.

## ABSTRACT

The present research aimed to design, build and equip a photobioreactor system on a laboratory scale to house and multiply the microalgal species *Scenedesmus quadricauda* also be able to consume CO<sub>2</sub> from a CO<sub>2</sub> gas balloon as original source. For their design parameters were taken as the number of tubes which were 5 in total; material and degree of transparency of the tubes were completely transparent polycarbonate and, angle of inclination of tubes of 45 to 90 degrees, each tube was equipped with a system of hoses to transport CO<sub>2</sub> with a wrench to harvest and / or sampling, a support system, which provided stability to the photobioreactor and consisted of a frame of iron with fasteners on the ends to support and contain tubes. To build the photobioreactor system were considered variables as volume, with a total capacity of 17,5 L, a final height of 59,5 cm and a diameter of 9,5 cm for each of the tubes. In the operating phase, was conditioned system for the optimal operation of the regulating variables such as light intensity through a Raschell net, ranging from 158000 Lux to direct light to 51200 Lux 35% shaded ,shade average temperature of 19 ° C , pH of from 7,14 to 8,2; 2% CO<sub>2</sub> flow rate and constant agitation, final volume of 3,5 L (per tube), an initial charge of *Scenedesmus quadricauda* of  $4.5000 \cdot 10^6$  cells / ml in a span of nine days. Finally, CO<sub>2</sub> feeding worked well to give a final consumption of 0,027 mol CO<sub>2</sub> / L and growing compared to the absence of it with just 0,014 mol CO<sub>2</sub> / L at its peak.

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

Es indudable que en nuestros días el cambio climático es uno de los grandes desafíos medioambientales del siglo XXI a considerar ya que sus impactos son globales y cada vez más severos, afectando la estabilidad económica, social y ambiental del planeta.

Entre los efectos más graves destacan los aumentos observados del promedio mundial de la temperatura del aire y del océano, el deshielo generalizado de glaciares, las modificaciones en los patrones de precipitación, los cambios en la intensidad y frecuencia de eventos climáticos extremos, entre otros. Las causas que explican estos patrones atmosféricos pueden ser varias; sin embargo, todo parece indicar que el aumento de la concentración de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y el efecto invernadero que produce, es la causa más importante.

Desde hace décadas, se conoce la estrecha relación entre el aumento continuo de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y el cambio global (IPCC, 2007). En este contexto, el CO<sub>2</sub> como GEI antropogénico más importante, se sabe que sus emisiones anuales aumentaron aproximadamente un 80% entre 1970 y 2000, con un valor de aproximadamente 4,6 Ton/hab per cápita, actualmente es de 5,1 Ton/hab .Y ello debido a que en las últimas décadas producto del progreso industrial, ha dado lugar entre otras cosas, la puesta en marcha de grandes fábricas que emiten diariamente por sus chimeneas enormes cantidades de emisiones de GEI (SINIA ,2012). Las emisiones de CO<sub>2</sub> originadas por actividades humanas proceden de diversas fuentes, en su mayor parte de la combustión de combustibles fósiles utilizados en la generación de energía, así como en el transporte vehicular y en los procesos industriales.

A lo largo de los años, se han investigado numerosas estrategias para reducir las emisiones de CO<sub>2</sub>, las cuales pueden clasificarse principalmente en dos categorías: reacciones químicas y reducción biológica del CO<sub>2</sub>. Actualmente la reducción biológica ha tenido mucho mayor interés porque permite la producción de energía a partir de la biomasa generada, con el consecuente proceso de fijación de CO<sub>2</sub>, (Wang et al., 2008).

Hoy en día somos más conscientes con el tema, es por eso que se ha comenzado a implementar nuevas medidas para disminuir las notorias emisiones de los gases contaminantes, siendo una de estas alternativas más reciente y eficaz, en comparación a otras técnicas la reutilización y aprovechamiento de los gases de efecto invernadero, en especial el CO<sub>2</sub> como insumo productivo en sistemas de cultivos controlados (fotobioreactores) para la masificación de microalgas y la consecuente reducción de CO<sub>2</sub>.

En tal sentido, contribuyendo al desarrollo de medidas medioambientales para contrarrestar el efecto de gases de invernadero, se pretende desarrollar el cultivo de algas unicelulares (*Scenedesmus quadricauda*) en un conjunto de fotobioreactores, los cuales llevan a cabo reacciones de fotosíntesis en las que el CO<sub>2</sub> captado del exterior es transferido a la fase acuosa de las algas, donde ocurre la conversión a gases menos tóxicos y cuyo resultado es la producción de O<sub>2</sub> y biomasa.

De esta forma, las microalgas como organismos fotosintéticos, actuarían como filtros biológicos que reducirían las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera. Además, la estrategia de utilizar microalgas para la reducción de CO<sub>2</sub> ofrece ciertas ventajas como son las altas tasas de crecimiento y habilidad para fijar CO<sub>2</sub> en comparación con las plantas agrícolas y acuáticas (Chisti, 2007); finalmente, la depuración biológica de CO<sub>2</sub> utilizando microalgas podría llegar a ser rentable al combinarse con la producción de biocombustibles, tratamiento de aguas residuales o la obtención de productos de alto valor agregado (Wang et al., 2008).

## 1.1 OBJETIVOS

### OBJETIVO PRINCIPAL

Diseñar, construir, acondicionar y hacer funcionar un sistema fotobio reactor para el consumo de CO<sub>2</sub> utilizando *Scenedesmus quadricauda* como agente biodepurante.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar y construir un sistema Fotobio reactor a nivel de laboratorio.
- Probar y acondicionar el sistema Fotobio reactor para el buen funcionamiento en la parte experimental.
- Evaluación del crecimiento microalgal de *Scenedesmus quadricauda* en el sistema Fotobio reactor.
- Evaluación de la eficiencia del efecto de la cantidad de intensidad luminosa en el crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en el sistema Fotobio reactor.
- Evaluación de la capacidad de consumo de CO<sub>2</sub> del sistema configurado a partir de *Scenedesmus quadricauda*.

## 1.2 HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

Considerando que las microalgas son organismos autótrofos fotosintéticos y poseen potencial capacidad descontaminadora de CO<sub>2</sub>, es que, utilizando un sistema hospedero Fotobioreactor, se consiga la mitigación total y/o parcial del CO<sub>2</sub> a partir del consumo del mismo mediante *Scenedesmus quadricauda* y así considerarlo como una alternativa para la descontaminación ambiental.

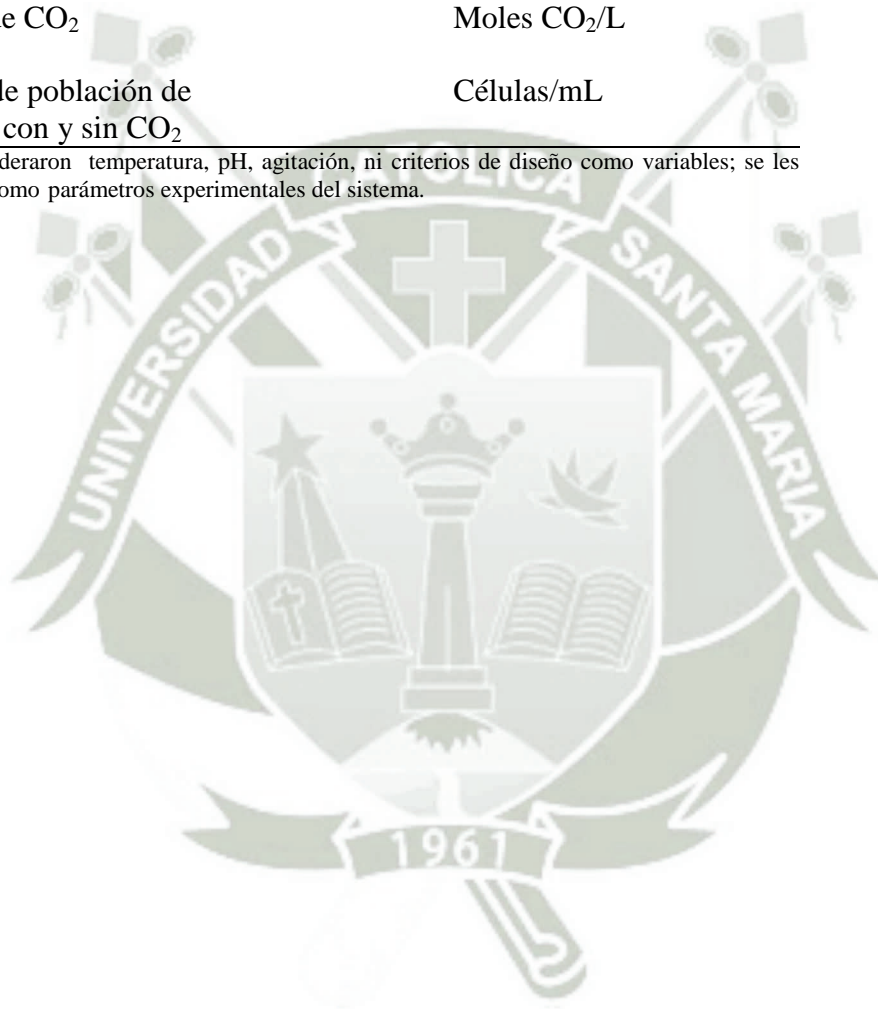


### 1.3 VARIABLES E INDICADORES

**Tabla N°1.** Variables e indicadores<sup>1</sup>

<b>Variables independientes</b>	<b>Indicadores</b>
Velocidad de flujo de CO <sub>2</sub> a partir de un balón de CO <sub>2</sub>	Flujo de CO <sub>2</sub> inyectado al sistema FBR, %
Intensidad de luz	Irradiación solar, Lux
<b>Variables dependientes</b>	<b>Indicadores</b>
Consumo de CO <sub>2</sub>	Moles CO <sub>2</sub> /L
Variación de población de microalgas con y sin CO <sub>2</sub>	Células/mL

1. No se consideraron temperatura, pH, agitación, ni criterios de diseño como variables; se les tomaron solo como parámetros experimentales del sistema.



## CAPITULO II

# MARCO TEÓRICO

### 2.1 CALENTAMIENTO GLOBAL

La Tierra absorbe la radiación electromagnética proveniente del sol, principalmente en la superficie y la distribuye por movimientos atmosféricos y oceánicos, una parte es transferida nuevamente al espacio con lo cual, se mantiene un balance entre la energía recibida y transferida. Cualquier proceso que altere tal balance, se reflejará como cambios en el clima.

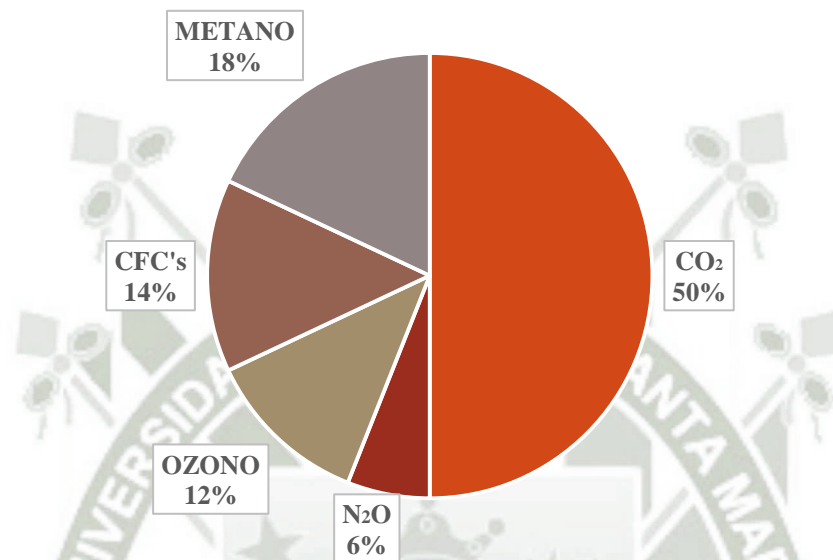
El incremento en la concentración de los gases de efecto invernadero reduce la eficiencia con la cual la Tierra devuelve la energía recibida al espacio, y parte de la energía que debería ser enviada al espacio no logra salir por la presencia de esos gases. Por tanto la temperatura de la superficie terrestre se eleva con el fin de emitir más energía, y aunque parte de ésta quede atrapada, suficiente energía saldrá al espacio para alcanzar el balance de radiación electromagnética que mantiene estable el clima del planeta.

Por ello, si las concentraciones de los gases de efecto invernadero continúan aumentando, la temperatura de la superficie del planeta seguirá incrementándose, y aun cuando las emisiones de estos gases se logren estabilizar, los efectos del calentamiento perdurarían, pues este tipo de gases tienden a permanecer por largos periodos en la atmósfera (Martínez y Fernández, 2004).

### 2.2 CAMBIO CLIMÁTICO EN EL PERÚ

El cambio climático es la variación del estado global del clima durante largos periodos de tiempo. Tiene sus orígenes en procesos naturales internos, forzamiento externo y cambios antropogénicos que afectan la composición global de la atmósfera. El calentamiento global, es un fenómeno de escala mundial que sucede por el aumento en la temperatura de la

atmósfera y de los océanos, ese incremento de temperatura es causado por la acumulación de agentes contaminantes como el vapor de agua ( $H_2O$ ), el dióxido de carbono ( $CO_2$ ), el metano, el óxido nitroso, etc, emitido por la quema de combustibles fósiles. Estos gases forman una capa gruesa que atrapa el calor del sol y causa el calentamiento del planeta.



**Fig N°1.** Contribución de los gases que producen el efecto invernadero al planeta en los últimos 10 años. (ACCEFYN<sup>1</sup>, 2011)

Los gases más importantes que producen el efecto invernadero son el dióxido de carbono, ozono, el metano, el óxido nitroso y los clorofluorocarbonos (CFC's). Se muestra el aumento de gases de efecto invernadero generados en la década pasada debido a las actividades humanas, y su presunta contribución al calentamiento del planeta. Evidentemente el dióxido de carbono es uno de los que más contribuyen al calentamiento del planeta. El vapor de agua, que no aparece en estas cifras, actúa en combinación con los otros gases para atrapar el calor que emite la Tierra.

1. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

El Perú es uno de los países más vulnerables ante el cambio climático, el tercer país más vulnerable después de Honduras y Bangladesh según el Centro Tyndall del Reino Unido. El cambio climático en nuestro país se ha visto fuertemente influenciado por el derretimiento acelerado de los glaciares que en la superficie total de los glaciares de nuestro territorio ha disminuido en un 22 % (Zapata, 2006), así como el incremento de la frecuencia e intensidad de fenómenos hidrometeorológicos extremos y la disminución de las precipitaciones en los últimos años. Según estudios hechos por el INRENA y el SENAMHI, se sabe que existe una relación entre el derretimiento de los glaciares y la temperatura del aire a 5000 m de altura. Esta temperatura está siendo modificada debido al

calentamiento global y por lo tanto se ha producido una aceleración del derretimiento de estos glaciales sobre todo en los últimos años. Esto muestra claramente el grave panorama y la amenaza futura para la población de grandes ciudades de nuestro país en los próximos años.

### **2.3 SITUACIÓN CLIMÁTICA EN LA REGIÓN AREQUIPA**

El clima de la región Arequipa ha sufrido variaciones considerables en el tiempo; un estudio realizado por la Cooperación Alemana (GTZ, 2008) muestra como en la década de 1971 a 1980 los mayores cambios en la temperatura y precipitaciones se registraron en las épocas de verano (Enero- Marzo) e invierno (Junio- Agosto). En la zona baja (hasta los 2500 msnm) las variaciones de temperatura alcanzan hasta 1,4 °C en el verano y 1,5 °C en invierno. En la zona media (2500 a 4000 msnm), las variaciones promedios alcanzan 1 °C en verano y 2,2 °C en invierno. Arriba de los 5000 msnm los valores de cambio son mayores a 1 °C en verano y a 2 °C en invierno (Alegre de la Cruz, 2008).

Así como la temperatura, la precipitación total anual en la región ha variado en el tiempo; de acuerdo al análisis de información histórico de las precipitaciones en Arequipa, se conoce que en la segunda mitad de los años noventa, la precipitación total anual más baja fue de 42,4 mm, registrándose en los años siguientes incrementos favorables para la región (181,9 mm en el año 2001). Sin embargo, a partir del año 2002, el total de precipitaciones por año disminuyó drásticamente llegando a los 18,3 mm en el año 2007. Esta modificación en los patrones de precipitación pluvial repercute en la dinámica de los ecosistemas y la actividad productiva de la región. El resultado más notorio de estos fenómenos es la reducción drástica de la corteza glacial de los nevados de la Región (Coropuna, Chachani, Misti, Pichu Pichu, Solimana, Ampato, Sabancaya, Mismi, Hualca Hualca).

Es evidente que el aumento de las emergencias por temperatura, heladas, sequías, nevadas entre otros, se ha incrementado en los últimos años, dejando en evidencia la vulnerabilidad de nuestra región ante el cambio climático y la necesidad de aumentar nuestra capacidad de respuesta a sus efectos.

## 2.4 GASES DE EFECTO INVERNADERO

El oxígeno ( $O_2$ ) y el nitrógeno ( $N_2$ ) son los principales componentes de la atmósfera: el  $O_2$  constituye el 21 % y el  $N_2$  el 78%. Los gases de efecto invernadero corresponden al 1% restante de la composición atmosférica y en general están constituidos por tres o más átomos; los más importantes son el vapor de agua ( $H_2O$ ) y el  $CO_2$ ; los demás gases como el metano ( $CH_4$ ), los  $NO_x$  y los compuestos clorofluorocarbonados (CFC's) son gases traza en la atmósfera.

El efecto invernadero como tal es resultado de la absorción de los rayos solares que la atmósfera deja pasar por parte de la superficie terrestre, que entonces se calienta y en consecuencia emite radiación que es absorbida por la atmósfera. El efecto invernadero siempre ha existido y gracias a ello existe la vida en la Tierra tal y como la conocemos, sin embargo en los últimos siglos este balance, ha sido alterado como consecuencia del desarrollo humano y el desarrollo masivo de la industria, la cual ha incrementado significativamente los niveles de  $CO_2$  y gases traza a la atmosfera.

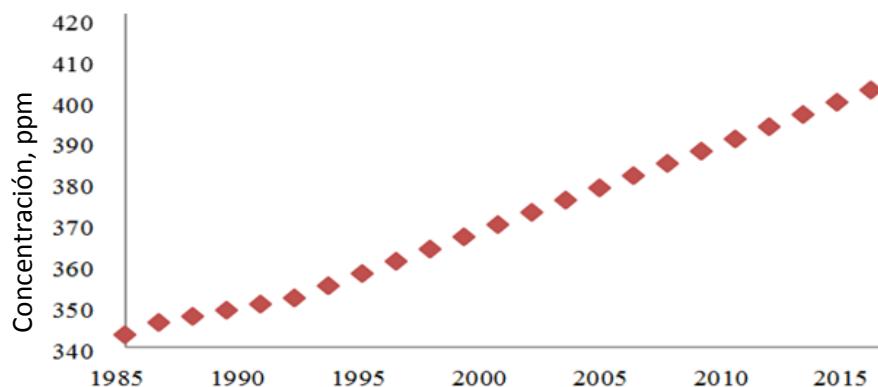
El incremento del  $CO_2$  se da por la quema de combustibles fósiles (petróleo, gas natural, carbón mineral) y la deforestación. Los gases traza son emitidos por artefactos y actividades industriales, domésticas, agropecuarias, etc. Con excepción de los CFC's, los gases de efecto invernadero se han encontrado de forma natural en el aire, sin embargo, el hombre ha provocado el aumento en las concentraciones de tales gases debido a las diferentes actividades industriales que realiza, causando un incremento en la temperatura atmosférica (Martínez y Fernández, 2004).

Según la Agencia de Protección ambiental (EPA), el  $CO_2$  constituye el 80% del total de todos los gases de efecto invernadero, seguido por el  $CH_4$  con concentraciones atmosféricas de 1774 ppb (partes por billón).

## 2.5 PAPEL DEL CO<sub>2</sub> EN LA ATMÓSFERA

Los dos átomos de oxígeno contenidos en el CO<sub>2</sub> vibran junto con el átomo de carbono y la frecuencia de esta vibración coincide con algunas de las longitudes de onda del infrarrojo de la radiación de onda larga. Cuando la frecuencia de la radiación emitida por la superficie de la Tierra y la atmósfera coinciden con la frecuencia de vibración del CO<sub>2</sub>, la radiación es absorbida por el CO<sub>2</sub> y es convertida en calor por la colisión con otras moléculas de aire y después es devuelta a la superficie terrestre. Como resultado de esta captura, la radiación saliente se reduce por el aumento del CO<sub>2</sub> y como éste se ha incrementado con el tiempo, se acumula en exceso la energía en el planeta. Dado que la vida media de una molécula de CO<sub>2</sub> en la atmósfera es de un siglo o más, actualmente miles de millones de toneladas de CO<sub>2</sub> antropogénico cubren de manera uniforme al planeta (Ramanathan y Feng, 2009).

Desde 1850, debido a la industrialización, la cantidad de CO<sub>2</sub> en la atmósfera se ha incrementado de 280 a aproximadamente 380 ppm (partes por millón). Actualmente la concentración de este gas es más alta de lo que había sido en los últimos 20 millones de años. El incremento en la tasa de producción de CO<sub>2</sub> hoy en día es cercano al triple con respecto a la tasa promedio registrada en 1990. Las emisiones crecen anualmente en promedio 3,1 % desde el año 2000 en vez de 1,1 % como era el caso en los años 90's, excediendo así los escenarios más pesimistas presentados en el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático, IPCC por sus siglas en inglés (Johansen, 2008).



**Fig N°2.** Concentración atmosférica del CO<sub>2</sub> y proyecciones al 2015<sup>1</sup>. (IPCC, 2011)

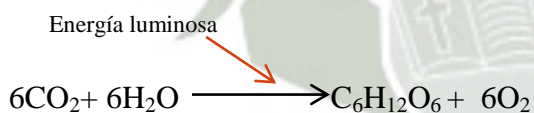
1. Adaptada de [http://www.ipcc-data.org/ddc\\_co2.html](http://www.ipcc-data.org/ddc_co2.html)

El IPCC ha advertido sobre el requerimiento de acciones inmediatas para evitar nuevos incrementos en los niveles atmosféricos existentes hoy en día, pues en ausencia de medidas rápidas y eficaces para controlar la situación, para el año 2100 se prevé que las concentraciones del CO<sub>2</sub> aumenten hasta 550 ppm o por encima de 830 ppm en el escenario más pesimista (Evans y Furlong, 2003).

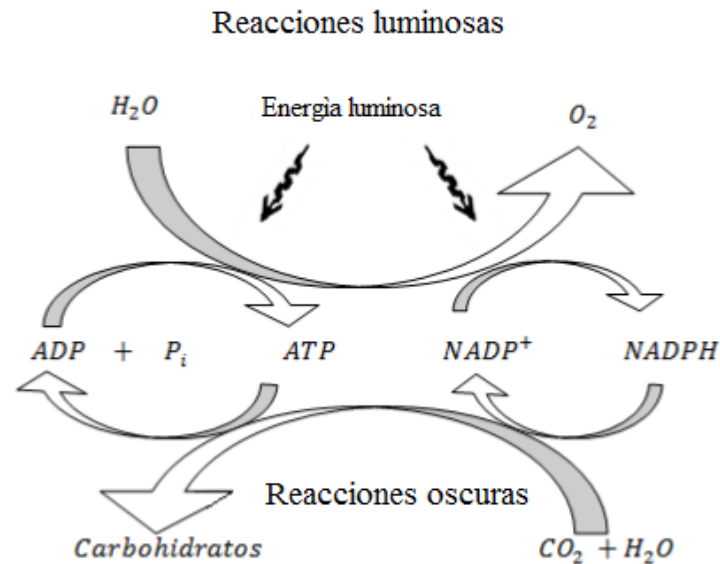
## 2.6 FOTOSÍNTESIS (CAPTURA Y FIJACIÓN DE CO<sub>2</sub>)

Las plantas, algas y algunos microorganismos utilizan la luz solar para obtener la energía necesaria en la síntesis de carbohidratos mediante un proceso que se denomina fotosíntesis, el cual además constituye la vía de captura y fijación del carbono y la fuente de oxígeno en la atmósfera. La asimilación fotosintética juega un rol importante y es una reacción de oxidación y reducción entre el agua como dador de hidrógenos y el CO<sub>2</sub> como aceptor de hidrógenos.

Existen dos tipos de fotosíntesis, una llamada oxigénica que es llevada a cabo por las plantas y algas, donde el agente reductor es el agua y otra anaeróbica que es realizada por bacterias, donde diversos compuestos orgánicos o inorgánicos actúan como donadores de electrones, según la especie.



La energía luminosa no puede utilizarse directamente para impulsar esta reacción y el H<sub>2</sub>O no reduce al CO<sub>2</sub> directamente. El proceso global está compuesto por dos subprocesos en todos los organismos fotosintéticos: el primero está constituido por una serie de pasos denominados reacciones luminosas, donde se utiliza la energía de la luz solar para llevar a cabo la oxidación fotoquímica del H<sub>2</sub>O; con esta oxidación se consigue primero que el agente oxidante NADP<sup>+</sup> se reduzca a NADPH, produciendo equivalentes reductores y la liberación del O<sub>2</sub> y, además que la energía luminosa se capture mediante el proceso de la fotofosforilación oxidativa. En el segundo subproceso llamado reacciones oscuras de la fotosíntesis, el NADPH y el ATP producidos por las reacciones luminosas se utilizan para la síntesis reductora de los carbohidratos a partir del CO<sub>2</sub> y el agua.



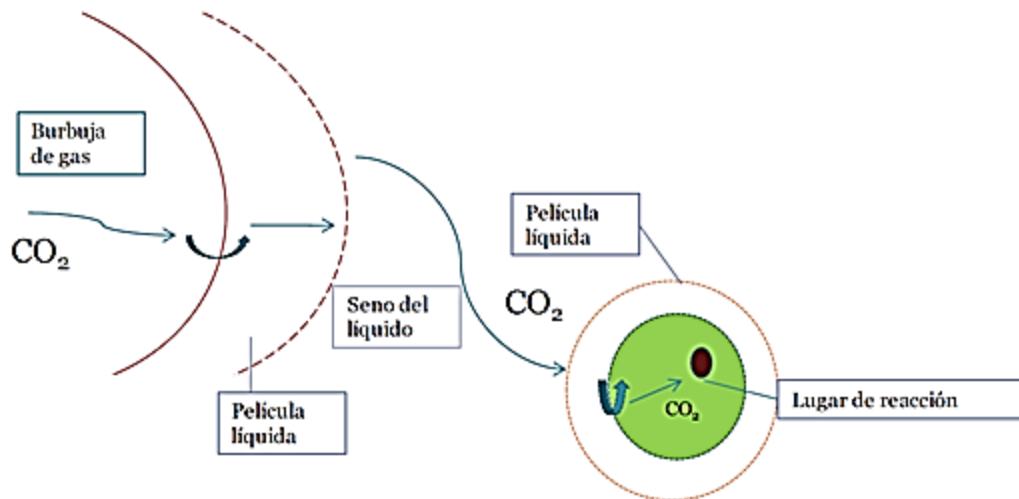
**Fig N°3.** Reacciones luminosa y oscura en la fotosíntesis. (Mathews, 2005)

Con respecto a las microalgas, debido a que aproximadamente el 50% de la biomasa está compuesta por carbono, este elemento es uno de los nutrientes más importantes para el crecimiento. Todas las microalgas utilizan el carbono inorgánico para sintetizar componentes orgánicos. La posibilidad de que las microalgas utilicen el carbono únicamente en forma de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  (Bicarbonato) o  $\text{CO}_3^{2-}$  (Carbonato), no es un problema porque las reacciones de interconversión entre las formas químicas son suficientemente rápidas para que no sea un paso limitante en la demanda de  $\text{CO}_2$  para las células.

Estudios detallados, sobre la influencia de la fuente de carbono sobre la productividad de las microalgas, han mostrado que aunque el  $\text{HCO}_3^-$  es fácilmente asimilado por las células, es una fuente pobre de carbono si se compara con el  $\text{CO}_2$ ; el contenido de  $\text{CO}_2$  en el aire es de 0,03% - 0,04% v/v, por lo tanto la transferencia del carbono al medio de cultivo es pequeña aun incrementándose el mezclado. Por ello, para el cultivo de microalgas es común utilizar corrientes gaseosas enriquecidas con  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono (Carvalho et al., 2006).

Cuando el  $\text{CO}_2$  es inyectado al cultivo, una parte es consumido por las células y el resto se pierde en la atmósfera. De acuerdo con la teoría de la doble película según Whitman, la

transferencia del  $\text{CO}_2$  de la fase gaseosa a las células ocurre a través de una secuencia de pasos (Figura 4): transporte del gas a la película del gas cercana a la interfase, difusión a través de la película gaseosa, transporte a través de la interface gas-líquido, difusión en la película del líquido, transporte hasta el líquido, difusión a través de la película líquida externa de la célula, transporte hasta la pared celular de las células y, por último, la absorción metabólica de las células (Citado por J.Coulson,1981) .

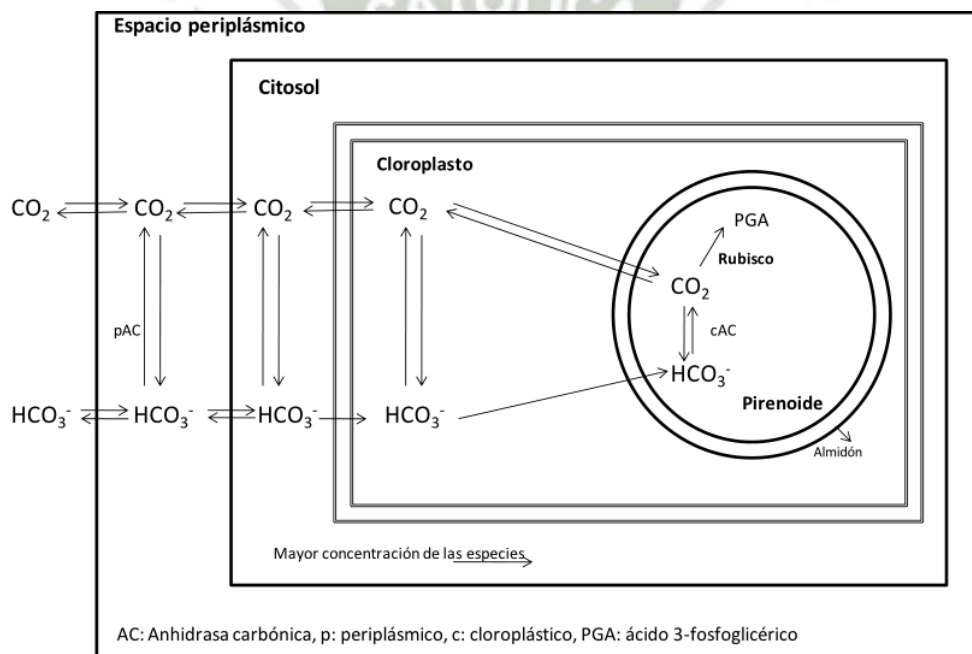


**Fig N°4.** Transporte del  $\text{CO}_2$  desde la formación de la burbuja de gas  $\text{CO}_2$  hasta el interior de las células microalgales. (Toledo, 2010)

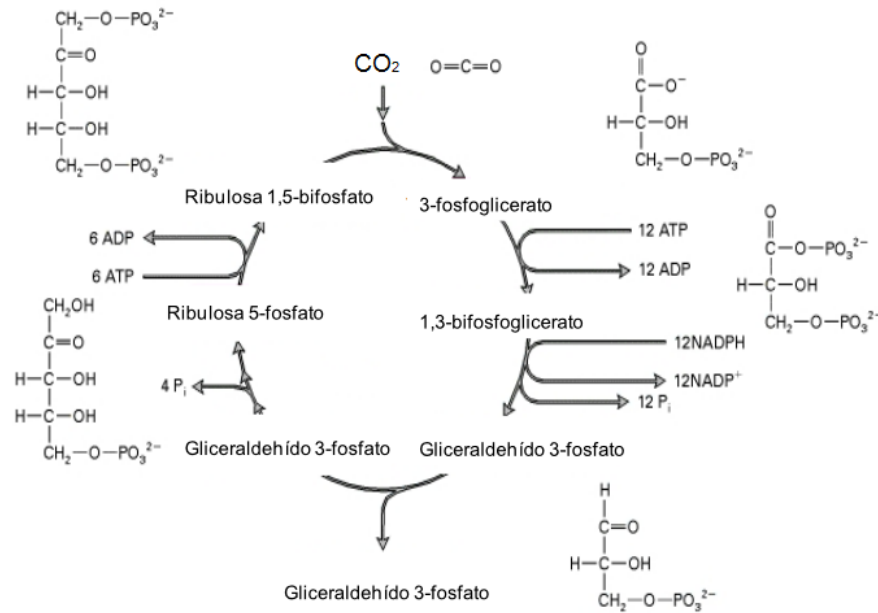
Cultivo de microalgas, el cual está siendo alimentado con una corriente gaseosa enriquecida con  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono. Cuando el  $\text{CO}_2$  es inyectado al cultivo, ingresa en forma de burbujas micro pulverizadas; una parte es consumida por las células microalgales y el resto se pierde en la atmósfera. La transferencia del  $\text{CO}_2$  en forma gaseosa a las células microalgales ocurre primero a través del transporte del  $\text{CO}_2$  a la interface gas-líquido del medio de cultivo, de ahí por difusión se transporta a través de la película líquida externa de la célula microalgal y finalmente se transporta hasta la pared celular de las células en donde ocurre la absorción metabólica de las células de la microalga.

El  $\text{CO}_2$  y el  $\text{HCO}_3^-$  son consumidos por las microalgas; el ion bicarbonato entra por transporte activo a la célula y el  $\text{CO}_2$  es hidratado en la membrana plasmática en un sitio activo cercano al del ion bicarbonato; ya en el interior de la célula, el  $\text{HCO}_3^-$  es transformado a  $\text{CO}_2$  por la anhidrasa carbónica. El  $\text{CO}_2$  es inmediatamente incorporado al ciclo de Calvin por la enzima Rubisco; el ácido 3-fosfoglicérico (PGA) es obtenido como metabolito intermediario e incorporado en las distintas rutas metabólicas para la síntesis de macromoléculas como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. El ATP y el NADPH producidos por las reacciones luminosas de la fotosíntesis actúan en la síntesis de carbohidratos en el ciclo de Calvin, el cual tiene tres fases bien diferenciadas:

- Carboxilativa, que corresponde a la incorporación de una molécula de  $\text{CO}_2$  a una de ribulosa-1,5-difosfato para formar un compuesto transitorio de seis átomos de carbono que se hidroliza rápidamente en dos moléculas de 3-fosfoglicerato (reacción catalizada por la Rubisco).
- Reductiva, donde se reduce el grupo carboxilo del fosfoglicerato a aldehído utilizando el  $\text{H}^+$  donado por el NADPH y se obtiene gliceraldehído-3-fosfato, reacción que requiere de la energía del ATP.
- Regenerativa, donde se recupera la molécula de ribulosa-1,5-difosfato aceptora del  $\text{CO}_2$ , por una serie de reacciones enzimáticas.



**Fig N°5.** Transporte del  $\text{CO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$  al interior de las células.  
(Moroney y Somanchi, 1999)



**Fig N°6.** Ciclo de Calvin. (Mathews y Van Holde, 2005)

En el estroma de los cloroplastos, una serie de reacciones exergónicas convierten el PGA o gliceraldehído 3-fosfato (G3P) en fructosa 1,6 difosfato y por último en disacáridos o azúcares; algunas moléculas de G3P, son además convertidas en aminoácidos o grasas (componentes esenciales de las algas). La fijación de seis moléculas de CO<sub>2</sub> y la formación de tres moléculas G3P, requiere del consumo de 18 ATPs y 12 NADPHs generados en las reacciones luminosas de la fotosíntesis.

## 2.7 MÉTODOS DE MITIGACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CO<sub>2</sub>

### - Captación de Carbono

Los sumideros de carbono pueden ser naturales o artificiales, la captación de CO<sub>2</sub> atmosférico por parte de la vegetación terrestre y su acumulación en los sedimentos de lagos y océanos es un proceso natural que actualmente almacena gran parte del CO<sub>2</sub> emitido por la actividad humana. También se han desarrollado tecnologías que consisten en la separación, transporte y almacenamiento a largo plazo, lo que sería un sumidero forzado

que el IPCC considera como una de las opciones de mitigación para la estabilización de las concentraciones de los gases de efecto invernadero.

- Fijación biológica como método de reducción del CO<sub>2</sub>

El ciclo global del carbono consta de tres principales reservas de carbono: la atmosférica, la oceánica y la terrestre. El ciclo comienza con la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico a través de los procesos de fotosíntesis, realizados por plantas y algas. Estos organismos incorporan el CO<sub>2</sub> atmosférico a los procesos metabólicos para la formación de materia orgánica y oxígeno, luego esta materia orgánica es degradada e incorporada de nuevo al ciclo del carbono.

El secuestro de CO<sub>2</sub> por parte del océano tiene lugar por medio de procesos fisicoquímicos y biológicos. La parte física se da por el intercambio del CO<sub>2</sub> ente la atmósfera y el océano. El proceso biológico se lleva a cabo por el fitoplancton. Dicha actividad biológica retira el CO<sub>2</sub> de las aguas superficiales y lo transporta hacia el interior del océano en forma de carbono orgánico y carbonatos (Aresta et al., 2005; Evans y Furlong 2003; Skjanes et al., 2007).

- Otras opciones de mitigación

Estas comprenden la mejora de la eficiencia energética, la preferencia de combustibles que dependan menos intensivamente del carbono, la energía nuclear, las fuentes de energías renovables, el perfeccionamiento de los sumideros biológicos, la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero diferentes al CO<sub>2</sub> y la aplicación de procesos biológicos.

## 2.8 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MICROALGAS

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares provistos de clorofila capaces de sintetizar complejos orgánicos a partir de sustancias muy simples como el agua, CO<sub>2</sub> y elementos minerales. Están localizados en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en

el planeta. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 especies (aunque se estima que existen más de 100,000), de las cuales con frecuencia se desconoce su composición bioquímica y metabolismo.

Las microalgas se clasifican de acuerdo a varios parámetros tales como pigmentación, ciclo de vida, morfología y estructura celular (Tabla 2). Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2008).

**Tabla N°2.** Clasificación de las microalgas<sup>1</sup>

CLASE	CARACTERÍSTICAS
Chlorophyta (algas verdes)	División conformada por una gran cantidad de especies, en particular por las que proliferan en ambientes dulce-acuícolas. Pueden existir ya sea como células individuales o colonias. Su principal reserva de carbono es el almidón, sin embargo pueden almacenar lípidos bajo determinadas condiciones. En esta división destaca la clase Prasinophyceae, caracterizada por incluir especies que forman parte del ‘pico-plancton’.
Bacillariophyta (diatomeas)	Las diatomeas predominan en aguas oceánicas pero también se les puede encontrar en aguas dulces y residuales. Se caracterizan por contener silicio en sus paredes celulares. Almacenan carbono de maneras diversas, ya sea como aceites o como crisolaminarina (polímero glucídico).
Cianobacteria	Las cianobacterias son microorganismos procariotes cuya estructura y organización son similares a las de las bacterias. Las cianobacterias desempeñan un papel relevante en la fijación del nitrógeno atmosférico.
Heterokontophyta	División constituida por una gran diversidad de clases dentro de las cuales destaca la Crysophyceae (algas doradas), conformada por especies similares a las diatomeas en términos de composición bioquímica y contenido de pigmentos. Las algas doradas se distinguen por los complejos pigmentos que las conforman, los cuales les proporcionan tonalidades amarillas, cafés o naranjas. Las especies de este grupo son principalmente de agua dulce. Sus reservas de carbono son los lípidos y los carbohidratos.

1. AlgaeBase, [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org); Hu *et al.*, 2008; Sheehan *et al.*, 1998  
Descripción de las principales divisiones en las cuales las microalgas han sido clasificadas de acuerdo a parámetros diversos tales como pigmentación, ciclo de vida, estructura celular, etc.

En cuanto a su estructura celular, existen dos tipos de microalgas, procariotas y eucariotas. Las microalgas procariotas o Cyanobacteria carecen de organelos, los cuales están limitados por una membrana y tienen ribosomas más pequeños.

Las microalgas eucariotas se definen por la presencia de una doble membrana en el núcleo y presencia de cloroplastos. Muchas microalgas son unicelulares no móviles, mientras que otras poseen uno o más mecanismos de locomoción, flagelos a través de poros en la pared, con los cuales pueden realizar migraciones verticales en los cuerpos de agua (Graham y Wilcox, 2000).

Existen tres tipos principales de pigmentos en las microalgas, las clorofilas, los carotenoides (que incluyen a las xantofilas) y las ficobilinas. Las algas fotosintéticas tienen clorofila en sus cloroplastos. En todas las microalgas la clorofila es el principal pigmento fotosintético y varía en cantidad de 0,3 a 3 % de su peso seco. Los carotenoides son pigmentos amarillos, anaranjados o rojos y en general se pueden dividir en dos clases: los carotenos, que son cadenas complejas de hidrocarburos libres de oxígeno y sus derivados oxigenados o xantofilas. Otro pigmento de las microalgas son las ficobilinas, las cuales están unidas a proteínas, por lo que se denominan comúnmente ficobiliproteínas (Dawes, 1991; Lee, 1999).

Los procesos de reproducción asexual son muy variados, por bipartición (división celular longitudinal o transversal), formación de zoosporas o aplanosporas, producción de autosporas o monosporas, formación de autocolonias, fragmentación (ruptura de los filamentos) y formación de acinetos (células vegetativas con una gruesa pared celular y alto contenido de sustancias de reserva, usualmente conocidas como estructuras de resistencia). En la reproducción sexual, las microalgas tienen diferentes vías, desde la fusión de los gametos (haploides, plasmogamia) hasta la que se logra por fusión nuclear (cariogamia) para formar un cigoto diploide (Graham y Wilcox, 2000).

En cuanto a factores limitantes, para el crecimiento de cualquier organismo fotosintético se requiere, luz, CO<sub>2</sub>, agua, nutrientes minerales en solución y una temperatura ambiente adecuada para la actividad metabólica. Cuando el suministro de CO<sub>2</sub> y agua no son limitantes, factores como la temperatura, iluminación, turbulencia, viscosidad del agua y la tasa de renovación del agua son importantes para las microalgas. Todas las especies tienen

rangos óptimos de desarrollo según las características de luz, temperatura y tolerancia al CO<sub>2</sub> (Tabla 3); cuando estos factores cambian, las poblaciones existentes adaptadas a estas condiciones disminuyen o incluso desaparecen, y son sustituidas por otras especies adaptadas a las nuevas características.

**Tabla N°3.** Tolerancia al CO<sub>2</sub> de varias especies<sup>1</sup>

ESPECIE	CONCENTRACIÓN MÁXIMA DE CO <sub>2</sub>
<i>Cyanidium celdanum</i>	100%
<i>Scenedesmus sp.</i>	80%
<i>Chlorococcum littorale</i>	60%
<i>Synechococcus elongates</i>	60%
<i>Euglena gracilis</i>	55%
<i>Chlorella sp.</i>	50%
<i>Eudorine sp.</i>	20%
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	15%
<i>Nannochloris sp.</i>	15%
<i>Chlamydomonas sp.</i>	15%
<i>Tetraselmis sp.</i>	14%

1. OILGAE, 2009

En cuanto a trabajos experimentales de descontaminación ambiental, las microalgas han sido propuestas para el tratamiento del aire (fijación de CO<sub>2</sub> y NO<sub>x</sub>) y de aguas en aspectos de remoción de DBO y metales pesados (Gonzales et al., 1997; Prakash et al., 1999).

A nivel de laboratorio se desarrolló método de depuración de bajo costo para aguas residuales urbanas basado en la actividad de las microalgas (*Scenedesmus* y *Chlorella*) en

un fotobioreactor cerrado, determinándose inicialmente los parámetros de diseño, procesos de depuración y por último se evaluó el método de depuración. Como resultado se pudo obtener un 100% de remoción de los bioindicadores de contaminación microbiológica fecal bacteriana (Moreno ,2008).

## 2.9 CRECIMIENTO DE LAS ALGAS

### FASES DE CRECIMIENTO

El crecimiento es un incremento ordenado de todos los componentes de un organismo y no de algunos de sus constituyentes; en organismos unicelulares la multiplicación celular es consecuencia del crecimiento (incremento en el número de individuos), mientras que en organismos multicelulares la multiplicación celular resulta en un incremento del tamaño de dichos organismos. El crecimiento de los cultivos puede expresarse en términos de la división celular (duplicación diurna) y/o crecimiento (tasa relativa de crecimiento).

Se pueden dar 5 fases de crecimiento en un cultivo normal de microalgas, en las que se definen por el número de células presentes a un tiempo (edad) determinado y por las condiciones generales del cultivo.

#### - Fase de latencia o fase inicial

Cuando un cultivo es transferido a un medio apropiado y mantenido en óptimas condiciones, el crecimiento exponencial puede ocurrir inmediatamente, sin embargo en algunos casos, un crecimiento constante se establece solamente después de cierto período de tiempo conocido como fase Lag. Esta primera fase es a veces aparente debido a la introducción de células muertas, mientras que un verdadero Lag puede atribuirse a varios factores:

- ❖ Desactivación de enzimas en el inóculo
- ❖ Disminución del nivel metabólico en el inóculo
- ❖ Células que aumentan de tamaño pero que no se dividen
- ❖ Actividad metabólica de las células inactivan algún factor tóxico presente en el medio

- ❖ Introducción del inóculo en un medio conteniendo altas concentraciones de una sustancia particular (fosfatos, antibióticos, etc)

En esta fase es poco el incremento o densidad celular, es una fase de adaptación de las células a las nuevas condiciones de medio. Muchas enzimas metabólicas llegan ser inactivas y las concentraciones de los materiales celulares caen a niveles que afectan la división de las células, antes de reanudar el crecimiento, a las algas les toma un corto periodo de tiempo aclimatarse a su medio acuático. Otro factor que contribuye a la fase inicial es el requerimiento de alcanzar los niveles máximos de compuestos específicos antes de que la fase exponencial comience; altas concentraciones de Ca, Mg o P pueden extender la fase de latencia.

#### - **Fase exponencial o desarrollo logarítmico**

Esta fase se obtiene cuando el cultivo adquiere una tasa constante de crecimiento ya que el número de células se duplica durante cada generación y la población se incrementa con la potencia de 2 que corresponde al logaritmo de base 2; por lo tanto, en un cultivo creciendo exponencialmente, el logaritmo de base 2 del número de células incrementa en proporción directa al tiempo, por esta razón el crecimiento es a menudo referido como fase logarítmica.

Esta fase se caracteriza por la rápida y constante división celular dependiendo del tamaño del cultivo (área superficial), intensidad luminosa (debajo del nivel de saturación) y la temperatura; sin embargo, dura corto tiempo debido a las variaciones ocasionadas por el crecimiento de la alga misma, por ejemplo la luz que tiene un remarcado efecto. Durante las fases iniciales del crecimiento, cuando la densidad poblacional es pequeña, todas las células están saturadas de luz con la subsiguiente disminución del crecimiento.

La fase exponencial puede presentarse del segundo día al tercer día después de inoculado y prolongarse hasta 4 días.

#### - **Fase lineal**

Cuando un cultivo de algas llega a ser denso, el crecimiento procede de manera lineal, habiéndose demostrado que esta fase puede establecerse solamente por el factor luz ya que la población densa reduce considerablemente la penetración de la luz.

La fase lineal o de declinación relativa del crecimiento puede verse afectada por varios factores:

- ❖ Autosombreado de los cultivos
- ❖ Reducción de la tasa específica de crecimiento
- ❖ Agotamiento de ciertos nutrientes
- ❖ Cambio del pH debido a la absorción preferencial
- ❖ Interferencia de la fotosíntesis por la respiración

Esta fase puede durar de uno a dos días en que la edad del cultivo alcanza su valor máximo.

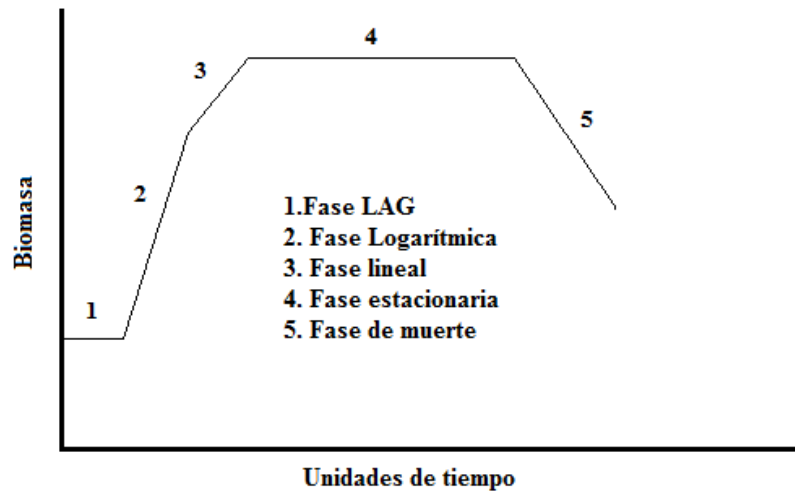
#### - **Fase estacionaria**

En ésta fase existe una disminución de la tasa de crecimiento por el limitado abastecimiento de luz y la creciente interferencia de la fotosíntesis por la respiración por parte de las algas. El rompimiento oxidativo de las sustancias orgánicas sintetizadas empiezan a reducir el crecimiento, es decir, disminuye la habilidad de los sistemas enzimáticos para utilizar rápidamente los recursos para formar biomasa y la curva de crecimiento alcanza un valor limitante que puede describirse como la máxima concentración obtenible de biomasa algal (Koch, 1981).

En esta fase, el factor limitante (carencia de nutrientes) y tasa de crecimiento están balanceados, es decir, que las densidades celulares se mantienen relativamente constantes por un periodo relativamente prolongado. Esta fase es muy corta en grupos de cultivos donde los nutrientes son consumidos y no reemplazados.

#### - **Fase de declinación o muerte**

Durante esta fase las células sufren la completa limitación por escasez de nutrientes o abastecimiento de luz; la densidad celular comienza a caer rápidamente liberando azúcares, proteínas o lípidos, los cuales son aprovechados en algunos casos por bacterias oportunistas que se alimentan de ella desplazando a la población que aún se mantiene viva, pero que rápidamente colapsa.



**Fig N°7.** Curva de crecimiento típica de un cultivo de algas.

Cuando un cultivo crece bajo condiciones óptimas de iluminación, abastecimiento de CO<sub>2</sub>, nutrientes y temperatura constante, su curva de crecimiento sigue un patrón sigmoideo en la que se puede reconocer 5 fases: Lag, logarítmica, lineal, estacionaria y de muerte.

## 2.10 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE MICROALGAS

Las microalgas son organismos que viven en el agua (agua dulce o agua salada) o en ambientes terrestres de elevada humedad; crecen de manera espontánea en ambientes acuáticos y húmedos. Sin embargo pese a su abundancia en la naturaleza, para su cultivo controlado se debe tener en cuenta la obtención de la variedad de microalga adecuada en función de la utilidad que se quiera obtener de ella.

El papel de las algas en la naturaleza es de suma importancia ya que, gracias a la fotosíntesis, son capaces de transformar la materia inorgánica en materia orgánica utilizando para ello la energía del sol. En el proceso de la fotosíntesis, empleando la energía del sol, se combina el CO<sub>2</sub> atmosférico con el agua y como resultado se produce oxígeno que se libera a la atmósfera y azúcares que la microalga empleará para producir distintas sustancias como la celulosa que conforma su estructura.

## MEDIOS DE CULTIVO

Se han desarrollado muchas clases de medios de cultivo a fin de asegurar los requerimientos básicos de las algas. Un medio de cultivo óptimo debe soportar a las especies a cultivarse en él, debe contener además de sales minerales, fuentes de energía y materiales para la síntesis celular. Generalmente los medios de cultivo son líquidos y sólidos.

### - Medios líquidos

La mayoría de las algas crecen con facilidad en medios puramente inorgánicos recomendándose utilizar sales anhidras. El aspecto más importante del medio de cultivo es la forma en la que la fuente nitrogenada es abastecida, pudiendo las microalgas metabolizar nitratos, nitritos, amonio y otras fuentes orgánicas. Algunas cianofitas son capaces de utilizar el oxígeno atmosférico. Otro aspecto importante es el cambio de pH como resultado de la absorción preferencial de la fuente nitrogenada, así tenemos que la absorción del nitrógeno amoniacal ocasionan una disminución del pH, mientras que la asimilación del nitrato la aumenta. Pese a que los medios de cultivo presentan todos los elementos nutritivos necesarios, a veces las algas crecen poco o nada debido al requerimiento de sustancias o factores nutricionales especiales. El uso de extractos de suelo y otras sustancias satisface mucho estos requerimientos, en consecuencia, la evaluación de los requerimientos nutricionales necesita la formulación de un medio ideal para el óptimo crecimiento de determinadas algas.

### - Medios sólidos

Estos medios tienen la gran ventaja de poder licuarse con el calor y al enfriarse retornar al estado sólido. Estos medios son utilizados para inmovilizar a individuos simples o células individuales, separarlas de otros organismos así como proveerles de adecuados nutrientes para su reproducción. Para la preparación de los medios sólidos es muy común la utilización del agar, que es un polisacárido que agregado a la solución nutritiva produce un gel firme que se derrite a 95 °C, pero que no solidifica hasta enfriarse debajo de 45 °C, el medio agarizado enfriado puede incubarse a temperaturas tan altas como a 60 °C sin derretirse. El agar por ser una sustancia orgánica puede proporcionar algunos nutrientes

requeridos por las algas, por ello es difícil aislar cultivos puros ya que invariablemente crecen hongos y bacterias. Un buen agar solidificado deberá presentar un color ligeramente azulado y no amarillento, esto último significará que el agar ha sido sobrecalentado.

## TIPOS DE CULTIVO DE MICROALGAS

Los sistemas para producción de microorganismos fototróficos son llamados fotobioreactores, estos sistemas se evalúan en términos de su configuración, productividad y viabilidad económica. La más importante diferencia en los sistemas de producción de microalgas es la exposición del cultivo al ambiente, por ello se clasifican en dos diseños básicos:

### - Sistemas abiertos

Respecto a los sistemas empleados con mayor frecuencia en la producción de biomasa de microalgas tenemos a los de tipo abierto. Este sistema, que a pesar de sus formas y tamaños diversos, destacan por asemejarse al entorno natural de las microalgas. Estos cultivos comprenden sistemas naturales (lagos, lagunas, estanques), artificiales, de superficie inclinada y estanques tipo circuito (raceway ponds), siendo estos últimos de uso más extendido.

### - Sistemas cerrados (Fotobioreactores)

Los fotobioreactores (FBR) son conductos cilíndricos transparentes aislados del exterior en los cuales se desarrollan las microalgas. Estos tubos se colocan al exterior para captar mayor cantidad de radiación solar.

En contraste con los sistemas abiertos, este sistema de cultivo ofrece numerosas ventajas como son: pérdidas mínimas de  $\text{CO}_2$ , riesgo reducido de contaminación, mayor control de las condiciones de cultivo, ahorro de agua y nutrientes, menores requerimientos de superficie, flexibilidad de diseño, cortos periodos de producción y productividades considerablemente superiores (5 a 13 veces).

En cuanto a su estructura, los FBR, teniendo como propósito fundamental coleccionar la mayor cantidad posible de energía solar por unidad de superficie, presentan configuraciones de tipo tubular (vertical, horizontal, helicoidal, conformación  $\alpha$ ), paneles planos y columnas de burbujeo. La consideración de factores tales como luz, relación  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ , temperatura,

nutrientes, salinidad, pH, entre otros, son trascendentales para el diseño de sistemas cerrados.

En ese sentido, los reactores de tipo tubular para el cultivo de microalgas son los de uso más frecuente; habitualmente están conformados por dos unidades, una de recolección de luz y otra de transferencia de gases. Las altas productividades propias a estos sistemas precisan de una penetración y distribución óptima de la luz, condición que a su vez requiere de materiales de construcción transparentes y de relación superficie/volumen elevadas, sin embargo, la intensidad de la luz incidente debe ser moderada, de lo contrario podrían presentarse fenómenos de fotoinhibición (Pulz & Scheibenbogen, 1998; Pulz, 2001; Carvalho *et al.*, 2006; Chisti, 2007; Rittmann, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Wijffels, 2008).

## **REQUERIMIENTOS MEDIOAMBIENTALES DE LAS MICROALGAS**

El crecimiento de las microalgas dependen esencialmente, del pH del medio acuático, temperatura, composición de los nutrientes, luz y disponibilidad de CO<sub>2</sub>, entre otros (Lewin, 1967).

### **- Concentración de iones Hidrogeno (pH)**

La reacción del medio (ácido o básico), es un factor importante que influye notoriamente en la existencia de un organismo. Todos los líquidos constituidos por agua, contienen iones hidrógenos (H<sup>+</sup>) e hidroxilos (OH) libres cargados eléctricamente en variadas proporciones. La mayoría de sustancias cuando se disuelven en agua se ionizan en mayor o menor grado, de manera que cuando se añade ácido aumenta la concentración de H<sup>+</sup>, mientras que con la adición de una base su concentración disminuye.

El pH del medio siempre debe ser ajustado después de la esterilización bajo condiciones asépticas ya que la esterilización en si misma provoca cambios. El pH inicial del medio cambia debido al crecimiento del organismo ya sea por absorción selectiva de iones o por productos liberados o por ambas razones.

Debido a que el crecimiento responde a diferente pH de las especies y como la composición del medio y el pH interactúan para modificar la respuesta al crecimiento, estas

interrelaciones deben comprenderse bien antes de asignar condiciones óptimas de crecimiento a las microalgas.

Bajo condiciones de inadecuado control del pH, el crecimiento de las algas puede ser errático o pobre. Para prevenir cambios excesivos de pH, se utilizan sistemas buffer que son soluciones conteniendo mezclas de un ácido débil y una base conjugada resistiendo cambios en la concentración de  $H^+$  cuando se añaden ácidos o bases. Muchas sustancias tienen la propiedad de actuar como buffers y son biológicamente muy útiles, tales como los carbonatos, bicarbonatos, fosfatos, aminoácidos y sus componentes, los polipéptidos, proteasas y proteínas. El pH también influye en la precipitación de los nutrientes presentes en medio acuático.

#### - Temperatura

La Temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en todas las formas de vida, hallándose diversas temperaturas óptimas para las microalgas, siendo consideradas como mesófilas (20-40°C), termófilas (40-70°C) o psicrófilas (menos de 20°C). Las altas temperaturas ejercen acción en el crecimiento y en la actividad celular, trabajando las células más rápidamente con el consiguiente rápido desgaste, por ello los cultivos a altas temperaturas mueren.

La influencia de la temperatura sobre las algas puede ser considerado desde 2 puntos de vista: ecológico, con principal interés de su influencia en la distribución de la especie; y fisiológico, para comprender los mecanismos bioquímicos y biofísicos por la que ciertas especies prosperan en condiciones donde otras no pueden sobrevivir. Las microalgas por tanto son el material adecuado para estudiar la relación entre la temperatura y la actividad biológica debido al amplio rango de condiciones ambientales que ocupan y el alto grado de adaptación de ciertas especies a condiciones particulares.

#### - Iluminación

Siendo las algas principalmente fotoautótrofas, requieren de luz para su crecimiento y el efecto de la luz depende de la calidad o intensidad de la misma, así tenemos que altas intensidades luminosas generalmente son dañinas para muchas algas, observándose una destrucción de la clorofila.

Trabajos realizados en reactores tubulares horizontales de diámetro pequeño (1-3cm) y en reactores planos verticales e inclinados con *Spirulina platensis*, demostraron que se pueden lograr ciclos de luz/oscuridad lo que contribuye a obtener una alta productividad de microalgas. En cuanto a la trayectoria de la luz incidente, se tiene reportado que la reducción de ésta, provoca un aumento significativo de la densidad celular así como la velocidad específica de crecimiento. Esto quedó demostrado al hacer pruebas en un FBR de plano inclinado, con una trayectoria de luz de 10,4cm donde la productividad fue de solo 6% de la obtenida en otro reactor con una trayectoria de 1,3 cm (Hu *et al.*, 1996). Así mismo haciendo uso de un nuevo diseño de reactor tubular horizontal, investigadores reportaron un aumento del 77% en la productividad volumétrica cuando el diámetro del tubo fue diseñado entre de 2,8 y 5 cm (Richmond *et al.*, 2000).

Si bien es cierto, la actividad fotosintética de las microalgas requiere de una fuente de luz, pero aún no se conoce con precisión la intensidad y la duración en exposición del cultivo; en el diseño de equipos se requiere tener una fuente de luz, en las horas diurnas la luminosidad se puede obtener por medios naturales, ubicando el equipo en sitios adecuados, en horas nocturnas se puede proporcionar la luminosidad por medios artificiales. La selección del tipo de luz se hace con respecto a los pigmentos que se presentan en cada microalga, y con base en este dato se selecciona el tipo de luz y la longitud de onda más conveniente, la excesiva longitud de onda produce el efecto de fotoinhibición y la baja longitud de onda produce la fotooxidación; los daños celulares menores ocasionados por exposiciones largas pueden ser reparados si se coloca el medio de cultivo en la oscuridad, (Kommareddy, *et al* 2004).

La luz como parámetro fundamental para el cultivo de algas, actúa de forma individual o relacionada con otras variables. La radiación fotosintéticamente activa utilizable por las microalgas, abarca desde los 400 a los 700 nm, comprendida dentro de la luz visible. La tasa de fotosíntesis aumenta con la intensidad luminosa, pero una sobresaturación de mayor intensidad provoca la fotoinhibición del cultivo, debido a una destrucción a nivel de pigmentos fotosintéticos.

- Aireación

El crecimiento de algas de cultivos estancados son mucho menores que en cultivos aireados con adecuada mezcla de gases. Esto se debe principalmente a la concentración de la cantidad de los gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ). Los cultivos pueden ser aireados por simple inyección del aire atmosférico o pasándolo a través de una mezcla de  $\text{CO}_2$  y aire en proporciones adecuadas, generalmente de 5 a 10% de  $\text{CO}_2$  en aire. El mejoramiento en la tasa de aireación mediante la agitación o burbujeo, prolongará el crecimiento exponencial. La aireación de los cultivos permite la agitación de la suspensión de algas evitando la sedimentación de las mismas, así como incrementa la disponibilidad de los nutrientes para las algas.

El  $\text{CO}_2$  es la especie química que los sistemas fotosintéticos utilizan como fuente de carbono para la síntesis de una gran variedad de moléculas orgánicas. Las algas no la incorporan directamente de la atmósfera sino del  $\text{CO}_2$  que se halla disuelto en el ambiente acuoso reaccionando primariamente para formar ácido carbónico.



Este ácido es muy débil y se disocia para formar bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ) que a su vez también puede disociarse para formar iones de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Ambos iones se hallan en equilibrio de tal manera que el ion  $\text{H}^+$  ejerce importante rol, siendo el pH una de las propiedades más sensibles para detectar variaciones en el sistema acuático. Así, cuando el pH es más de 10, la especie predominante es el carbonato, pudiendo precipitar en forma de sales provocando la remoción de nutrientes; a pH 8 domina el  $\text{HCO}_3^-$  y a 4,5 lo es el  $\text{CO}_2$ . La dosificación del  $\text{CO}_2$  en forma de gas puro ayuda a estabilizar el pH y también actúa como fuente de carbono.

Puesto que el pH del cultivo indica la cantidad de  $\text{CO}_2$  disuelto, se han desarrollado diseños para mantener constante el pH mediante la inyección de cantidades controladas de  $\text{CO}_2$  a los cultivos (Vásquez, 1985).

-Orientación del fotobioreactor y dilución de la luz

Uno de los impedimentos principales para el uso eficiente de la energía solar es la variación continua de la radiación solar disponible a través del día. La radiación electromagnética solar es muy baja en la mañana y en las horas de la tarde; a mediodía es

lo suficientemente fuerte para inhibir la fotosíntesis. Aunque el patrón diurno de la radiación electromagnética solar en un reactor horizontal no puede ser modificado fácilmente, algunos sistemas de elevación pueden ser orientados a varios ángulos de acuerdo con el sol y así ofrecer la posibilidad para variar continuamente o discontinuamente la distribución de la luz que cae sobre la superficie del reactor.

## 2.11 USOS Y APLICACIONES DE LAS MICROALGAS

La comercialización a gran escala de microalgas comenzó en los años 60's, en Japón con el cultivo de *Chlorella spp.* por Nihon Chlorella (Taipei, Taiwan); en los 70's se cosechaba *Arthrospira maxima Setchell* en el lago Texcoco por Sosa Texcoco S.A (Ciudad de México, México). Para 1980, se contaba con 46 fábricas a gran escala en Asia, que producían más de una tonelada de microalgas por mes. Más recientemente se han establecido muchas plantas productoras de *Haematococcus pluvialis Flotow* como fuente de astaxantinas en USA e India (Spolaore *et al.*, 2006).

**Tabla N°4.** Microalgas utilizadas en la fijación de CO<sub>2</sub><sup>1</sup>

MICROALGA	T(°C)	%CO <sub>2</sub>
<i>Chlorella kessleri Fott et Nováková</i>	30	18
<i>Chlorella vulgaris Beijerinck</i>	25	aire
<i>Haematococcus pluvialis Flotow</i>	20	16-34
<i>Scenedesmus obliquus (Turpin) Kützing</i>	30	18
<i>Spirulina sp.</i>	30	12
<i>Dunaliella sp.</i>	27	3

1. Wang *et al.*, 2008

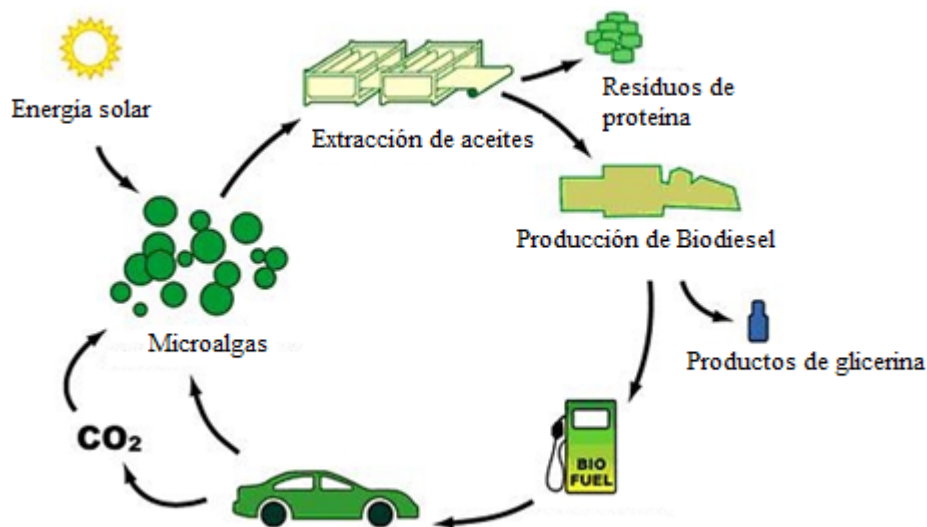
Información de algunas especies de algas en las que se ha estudiado en la fijación de CO<sub>2</sub>, algunas de las cuales pueden tolerar además de las altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, altas temperaturas, lo que las selecciona como candidatas para crecer con corrientes gaseosas generadas en las industrias termoeléctricas.

La utilización de microalgas para la captura de CO<sub>2</sub>, hoy por hoy resulta una buena opción para mitigar las concentraciones atmosféricas o las emisiones de las industrias relacionadas con la obtención de energía, sin embargo el balance de carbono, aún es un tema que no se ha aclarado, ya que la cantidad removida y recuperada como biomasa no concuerdan, en ningún estudio; estudios recientes han demostrado que el uso de microalgas como alternativa para disminuir las concentraciones de CO<sub>2</sub>, sólo puede ser económicamente

factible si se aprovecha la biomasa para la obtención de un producto de valor agregado (Spolaore *et al.*, 2006; Solovchenko *et al.*, 2007).

En otro aspecto, la variedad de metabolitos producidos por las microalgas es muy amplia y muchos tienen valor comercial. Las microalgas han comenzado a jugar un papel importante en la biotecnología; el primer uso de las microalgas por humanos data de hace 2000 años en China, donde utilizaban a la Cyanobacteria *Nostoc sp.* como alimento, sin embargo, la biotecnología de algas empezó a desarrollarse a partir de la mitad del siglo pasado.

Hoy en día, hay numerosas aplicaciones para las microalgas. Por ejemplo, pueden ser utilizadas para incrementar el valor nutricional de los alimentos para seres humanos y animales, juegan un papel crucial en la acuicultura, pueden ser incorporadas en los cosméticos e industrialmente son cultivadas para la obtención de moléculas de alto valor agregado, como fármacos, ácidos grasos poli-insaturados (agregados a las fórmulas de alimentos infantiles y suplementos nutricionales) y pigmentos utilizados como tintes naturales. También las microalgas pueden servir como materia prima para la obtención de diferentes tipos de biocombustibles renovables, esto incluye al metano producido por digestión anaeróbica de la biomasa algal, el biodiesel derivado del aceite de las microalgas y la producción fotobiológica de biohidrógeno (Spolaore *et al.*, 2006). **Fig N°8.** Diferentes

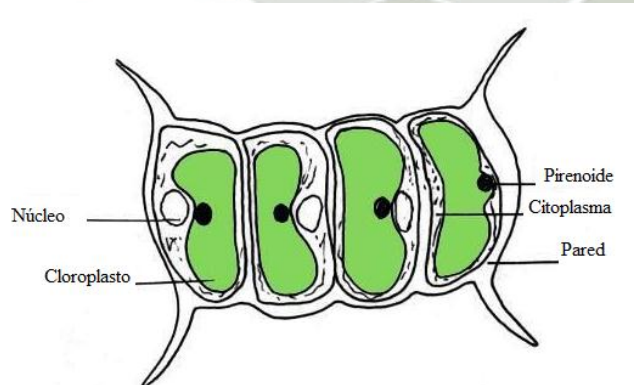


usos de las microalgas hoy en día. (Brevo Biodiesel, 2008)

En cuanto a sus aplicaciones ambientales, los gobiernos y compañías energéticas de todo el mundo han mostrado interés en la fijación biológica del CO<sub>2</sub>. Por ejemplo investigadores en Noruega, Japón, Italia y Estados Unidos se esfuerzan por encontrar un proceso económicamente factible, para la aplicación de microalgas en la protección del medio ambiente. En Alemania desarrollaron un proyecto para utilizar el efluente gaseoso y el agua condensada de una industria para producir biomasa microalgal; este proceso fue escalado a un fotobiorreactor de 6 m<sup>3</sup> y mostró ser viable, aunque no económicamente atractivo (Pulz y Gross, 2004).

## 2.12 GENERO *Scenedesmus*

*Scenedesmus* es un género de algas verdes de la familia *Scenedesmaceae*. Pueden presentar pared lisa o rugosa, así mismo forman colonias generalmente de 4-8 o 16 células cilíndricas, ovoides o fusiformes, las cuales, están ampliamente distribuidas en aguas dulces de curso lento y en suelo aunque a veces viven aisladas. Más que una agrupación colonial forman una asociación en cenobio (grupo de células que, tras dividirse, no se separan y permanecen en grupos dentro de una vaina o sustancia mucilaginosa), en la que no existe diferenciación de funciones. Generalmente esta microalga no se la encuentra aislada por lo que normalmente se la ve agrupada llegando a formarse una estructura geométricamente equilibrada.



**Fig N°9.** Estructura morfológica del género *Scenedesmus*. (Micromundo, 2012)

Esquema de la estructura de la microalga del género *Scenedesmus*. Se puede observar que contiene un núcleo, cloroplastos y los puntos negros representan al Pirenoide que cumple la función de reserva de almidón y puede contener además una reserva de aceite rica en vitamina A y vitamina D.

También se les llaman algas verdes debido a la abundancia de cromatóforos existentes al interior de la célula. Son organismos tanto unicelulares como pluricelulares, que viven solos o en colonias formando grupos. Pueden presentar una pared de revestimiento de celulosa o pueden estar desprovistos de recubrimiento propiamente.

Poseen cloroplastos, en los cuales se encuentra presente la clorofila a - b, beta-caroteno y pigmentos xantofilos. En su interior, la célula presenta en forma de glóbulos, material de reserva compuesto de grasa o aceite. Se reproducen asexualmente por división longitudinal aunque en algunas familias presentan reproducción sexual.



**Fig N°10.** *Scenedesmus sp.* (Yun Diatomeas Japón, 2012)

Datos morfológicos: longitud 8 a 42  $\mu\text{m}$ , ancho: 3 a 15  $\mu\text{m}$ . Clasificación científica: División: *Chlorophyta*; Clase: *Chlorophyceae*; Orden: *Chlorococcales*; Familia: *Scenedesmaceae*; Género: *Scenedesmus*; Especie: *Scenedesmus sp.*

Las dos células terminales están equipadas cada una con dos clavijas rectas o arqueadas. Cada individuo por consiguiente, puede organizarse en pequeñas autocolonias que una vez libres van creciendo normalmente para juntarse de nuevo para formar colonias. Estos organismos son fotosintéticos, pero en ausencia de luz pueden comportarse como quimioautotróficos, es decir, son capaces de realizar la síntesis de sustancias orgánicas a partir de  $\text{H}^+$ . La reproducción es por esporas no móviles llamados autosporas.

### 2.13 CARACTERÍSTICAS DE LOS FOTOBIOREACTORES

Según estudios, en 1983 se propusieron diferentes diseños de bioreactores contruidos con materiales transparentes como vidrio o policarbonato con el objetivo de perfeccionar esta tecnología y mejorar inconvenientes de contaminación, baja densidad celular, baja

productividad celular así como control de temperatura y pH (Pirt *et al.*, 1983; Gudín y Chaumont, 1983 y Torzillo *et al.*, 1986).

A principios de los 90, el cultivo intensivo de microalgas se hizo posible gracias al desarrollo de nuevos diseños de fotobioreactores, lográndose una productividad microalgal superiores a 100 toneladas por hectárea (Richmond, 2000).

Durante el cultivo de microalgas puede haber muchos factores que afecten su crecimiento, como la disponibilidad de los nutrientes, el oxígeno disuelto, pH, temperatura, etc, cuando ninguno de ellos es limitante, la disponibilidad de luz determina la velocidad con la que se realiza la fotosíntesis y como consecuencia la velocidad de crecimiento.

La cantidad de luz disponible para las células depende de la configuración del reactor. También en los FBR, la penetración de la luz decrece en función del incremento de la densidad celular, generando una zona eufótica(luminosa) y otra oscura , por tanto las microalgas están expuestas a periodos cíclicos de luz y oscuridad (fotoperiodo). La frecuencia y duración de estos ciclos están determinadas por el suministro de luz, la configuración del reactor y la intensidad del mezclado.

Esto impacta en la cantidad de luz recibida por cada célula y ayuda a prevenir la inhibición de la fotosíntesis en presencia de una alta irradiación, por ello los ciclos de luz y oscuridad son necesarios para lograr una alta eficiencia en la utilización de la luz.

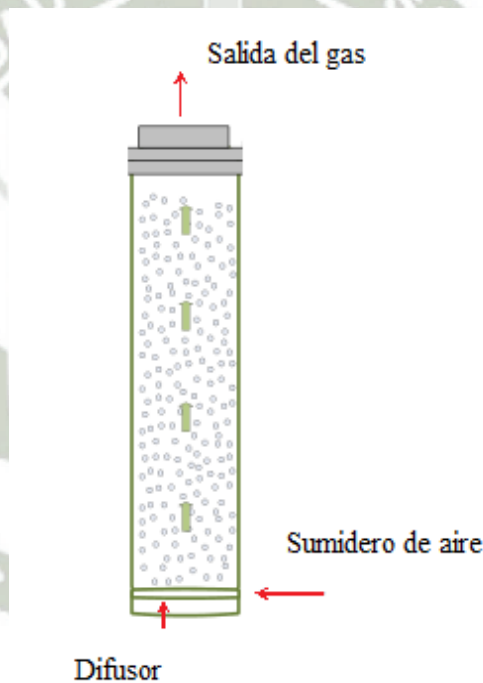
## 2.14 FOTOBIOREACTORES UTILIZADOS EN LA FIJACIÓN DE CO<sub>2</sub>

### COLUMNA DE BURBUJAS

En 2003, científicos del Centro de Investigación y Cultivo de Especies Marinas de Cádiz, diseñaron un fotobioreactor de columna tubular para el cultivo masivo de la microalga marina *Nannochloropsis gaditana*. Se trata de fotobioreactores diseñados para alcanzar niveles de producción de biomasa algal que permitan el abastecimiento en los criaderos de especies marinas; a partir de los cultivos realizados se evaluaron la influencia de la variación estacional de temperatura sobre el rendimiento del sistema; para ello se efectuó

un seguimiento del crecimiento de la biomasa y del consumo de nutrientes. Por otro lado, se evaluaron también factores como el gasto de  $\text{CO}_2$ , la evolución de la alcalinidad del medio y los cambios en la concentración de oxígeno disuelto. Los resultados obtenidos demostraron que el uso de estos sistemas representa mayor eficiencia en relación a magnitud en la biomasa producida por unidad de volumen en comparación con los sistemas convencionales de producción en bolsa o tanque abierto (Unamunzaga *et al.*, 2003).

En los FBRs de columna de burbujas, la aireación y la mezcla se alcanza mediante la inyección del gas, lo cual requiere de menor energía que la agitación mecánica. Las columnas son estructuras muy sencillas (Figura 11), consisten generalmente en un recipiente cilíndrico conteniendo solamente un difusor del aire comprimido y ninguna estructura interna adicional.



**Fig N°11.** Fotobioreactores de columna de burbujas. (Doran, 1998)

La función del difusor es de micro pulverizar las burbujas de gas de alimentación que se mezclan con el aire y hacer posible la homogenización en todo el medio del tubo fotobioreactor.

Las ventajas de estos reactores incluyen los bajos costos de producción, la ausencia de partes móviles y la adecuada transferencia de materia y calor. La hidrodinámica y transmisión de calor dependen por completo del comportamiento de las burbujas formadas

por el difusor. Los regímenes de flujo dependen del caudal del gas, del diseño del difusor, el diámetro de la columna y de las propiedades del medio de cultivo. En estos reactores de columna es difícil predecir con exactitud el tamaño de las burbujas y las corrientes de circulación del líquido (Doran, 1998).

#### FOTOBIOREACTORES AIRLIFT

En los FBRs de tipo airlift al igual que en las columnas de burbujas, la mezcla se produce sin agitación mecánica. Existen varios tipos de reactores airlift, el rasgo característico que la diferencia de las columnas de burbujas es que, las corrientes de flujo del líquido están más definidas, debido a la separación física de las corrientes ascendentes y descendentes. El gas es inyectado en la parte del reactor llamada riser (tubo de subida); así de este modo el gas dentro del reactor y la variación de la densidad producen un movimiento ascendente del líquido en el riser. Luego, el gas es expulsado en la parte superior del reactor y el líquido libre de burbujas se recircula a través del downcomer (tubo de descenso).

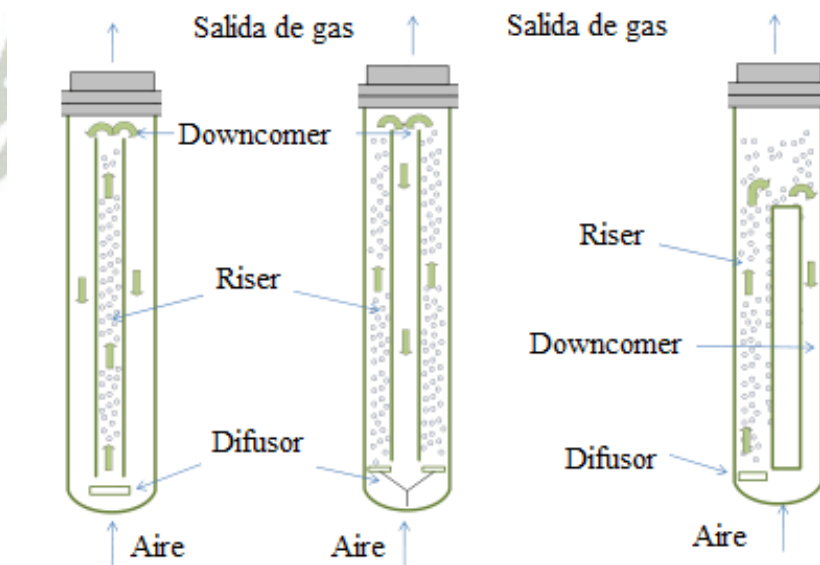


Fig N°12. Fotobiorreactores tipo Airlif. (Doran, 1998)

En la figura se puede apreciar las configuraciones más comunes de los reactores airlift. En el reactor de bucle interno (centro), el riser (tubo de subida) y downcomer (tubo de descenso) se encuentran separados por un tubo concéntrico, el reactor de bucle externo (derecha), el riser y downcomer se encuentran separados por secciones horizontales en la

parte superior e inferior. El rendimiento de estos reactores está influenciado por los detalles de construcción, como son la distancia entre la parte inferior del tubo, la diferencia de presiones, velocidad del líquido y el contenido de gas (Doran, 1998).

Los FBRs airlift generalmente proporcionan mejores mezclas que los de columna de burbujas excepto cuando se operan a velocidades bajas de líquido.

Datos experimentales en el cultivo de microalgas sugieren que en un FBR tubular como los diseños de columna de burbujas y airlift no se puede exceder de un diámetro de 0,2 m ya que esto reduce significativamente la disponibilidad de luz (Sánchez *et al.*, 2000).

Muchos tipos de FBRs pueden ser utilizados para la obtención de diferentes productos de microalgas, sin embargo aunque estos reactores sean fácilmente operables a nivel laboratorio, solo algunos de ellos son exitosamente escalados a nivel piloto. El escalamiento puede realizarse incrementando la longitud, diámetro, altura o el número de compartimentos de los sistemas de cultivo (dependiendo del tipo de FBR).

## 2.15 METODOS PARA DETERMINAR EL CONSUMO DE CO<sub>2</sub>

### DETERMINACIÓN DE CO<sub>2</sub> LIBRE

Se efectúa por valoración neutralizando el ácido carbónico que se encuentra en equilibrio con el CO<sub>2</sub> libre, mediante una solución de carbonato de sodio 0.05 N. Para la prueba, en una probeta de 50 ml, se introducen 10 ml de la muestra de agua. Se agregan 2 gotas de fenolftaleína, si aparece una coloración rosada no hay presencia de CO<sub>2</sub> en la muestra. Si en cambio, no hay coloración, se agrega 1ml de la solución de tartrato doble de sodio y potasio y se valora con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,05 N hasta aparición de un color rosado que desaparece al cabo de 3 minutos (Castillo y Pajón, 2010).

### DETERMINACIÓN DE CARBONATOS

Este ion se determina por valoración neutralizándose con una solución de HCl, previa adición de fenolftaleína como indicador. En un erlenmeyer se agregan 10 ml de muestra a

analizar. Si al agregar 1 gota de fenolftaleína el agua toma una coloración rosa eso significa que el pH es mayor de 8,1 y que el agua contiene iones  $\text{CO}_3^{2-}$ . Entonces se valora con una solución de HCl 0,01 N hasta desaparición de la coloración rosa (Castillo y Pajón ,2010).

#### DETERMINACIÓN DE $\text{CO}_2$ EN EL AGUA

Se efectúa también por valoración, en este caso utilizando una solución de NaOH como titulante. La reacción de  $\text{CO}_2$  con NaOH es:



La fenolftaleína es un indicador que presenta color rosa en soluciones básicas, cuando hay presencia de  $\text{CO}_2$  en la solución, ésta no presenta color, sin embargo al agregarle un cierto volumen de NaOH cuya concentración es conocida se puede determinar fácilmente la concentración del  $\text{CO}_2$  presente en la muestra. Para el cálculo de la concentración de  $\text{CO}_2$ , se utiliza la siguiente ecuación:

$$C_m = \frac{n}{V}$$

Donde:

n: Moles de  $\text{CO}_2$

V: Volumen agregado de NaOH

$C_m$ : Concentración molar de NaOH.

Como la relación es 1:1, los moles agregados de NaOH son iguales a los moles presentes de  $\text{CO}_2$  (Vizcarra, 2010).

#### CAPTURA DE $\text{CO}_2$

Para evaluar la captura de  $\text{CO}_2$  en un bioreactor, se define el porcentaje de remoción de  $\text{CO}_2$  y la capacidad de eliminación o captura de  $\text{CO}_2$ , a través de las siguientes ecuaciones:

Porcentaje de remoción de  $\text{CO}_2$ :

$$\% \text{CO}_2 = \frac{\text{CO}_{2E} - \text{CO}_{2S}}{\text{CO}_{2E}} \times 100$$

Capacidad de eliminación o captura de CO<sub>2</sub>:

$$CE_{CO_2} = \frac{[(P_0 + P_1 + P_H)Y_{CO_2E} - P_0Y_{CO_2S}]F \cdot M_{CO_2}}{R \cdot T \cdot V}$$

Donde CO<sub>2E</sub> es la concentración de CO<sub>2</sub> a la entrada de los reactores, CO<sub>2S</sub> es la concentración de CO<sub>2</sub> a la salida de los reactores (g m<sup>-3</sup>); P<sub>0</sub> es la presión atmosférica, P<sub>1</sub> es la presión de la placa del material de vidrio de los reactores, P<sub>H</sub> es la presión de la columna de agua (atm), M<sub>CO<sub>2</sub></sub> es el peso molecular del CO<sub>2</sub> (g mol<sup>-1</sup>), F es el flujo de entrada a los reactores (m<sup>3</sup>d<sup>-1</sup>), V es el volumen del medio de cultivo (m<sup>3</sup>), R es la constante universal de los gases (atm L mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), Y<sub>CO<sub>2</sub></sub> es la fracción mol a la entrada o salida del reactor (adimensional) y T es la temperatura del sistema K (Toledo ,2010).

#### DETERMINACIÓN DE CO<sub>2</sub> POR MEDIO DE INSTRUMENTOS ELECTRÓNICOS

Se utilizan los llamados analizadores de CO<sub>2</sub> .Se utilizan equipos diferentes para la medición de gases de combustión. Uno de ellos mide el CO<sub>2</sub> por medio de difusión/aspiración.



**Fig N°13.**Analizador de CO<sub>2</sub>: VAISALA, modelo MI70, utilizado para medir las concentraciones de CO<sub>2</sub>. (García Vicente, 2010)

Otro es el caso del medidor instantáneo de  $O_2$ ,  $CO$ ,  $CO_2$ , temperatura de los humos, temperatura ambiente, rendimiento, exceso de aire, relación  $CO/CO_2$  y  $CO$  ambiental.



**Fig N°14.**Analizador de  $CO_2$ : LANA SARRATE, modelo Khane 900 Plus. (García Vicente, 2010)

## 2.16 PERSPECTIVAS FUTURAS

El calentamiento global, es un problema que se ha venido manifestando desde hace algunas décadas y actualmente se están presentando muchos cambios a nivel climático que afectan de manera directa a nuestra ciudad, es por eso que con la presente investigación, se pretende reducir las emisiones de  $CO_2$  que la industria genera, para así evitar el calentamiento global que ocasiona.

De esta forma, las microalgas (organismos fotosintéticos) actuarían como filtros biológicos que reducirían las emisiones de  $CO_2$  a la atmósfera. Además, la estrategia de utilizar microalgas para la reducción de  $CO_2$  ofrece ciertas ventajas como son las altas tasas de crecimiento y habilidad para fijar  $CO_2$  en comparación con las plantas agrícolas y acuáticas (Chisti, 2007); y finalmente la mitigación biológica de  $CO_2$  utilizando microalgas podría ser rentable al combinarse con la producción de biocombustibles, tratamiento de aguas residuales o la obtención de productos de alto valor agregado (Wang *et al.*, 2008).

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de tesis fue realizado en la ciudad de Arequipa (2325 msnm), específicamente en el distrito de Miraflores, ubicado a  $16^{\circ} 23' 32,35''$  de latitud sur y  $71^{\circ} 31' 35,78''$ ,  $75^{\circ} 5' 52''$  de longitud oeste y una elevación de 2409 m.

Para la parte de la preparación del inóculo y condiciones iniciales de cultivo, se realizó en el laboratorio de la empresa comercializadora de algas “Los Andes S.A” .El equipo fue construido en un taller metal-mecánico y fue acondicionado cerca de 15 días en un ambiente semicerrado con acceso a luz solar y al aire libre; se utilizó el mismo espacio para el control, monitoreo y registros de la parte experimental. Finalmente se hizo uso del laboratorio H-302 de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa para evaluar las pruebas experimentales realizadas.

#### 3.2 MATERIALES

##### - Material biológico

Se utilizó como cepa microalgal a *Scenedesmus quadricauda* en toda la etapa experimental, debido a que es una especie de fácil cultivo y además de ser resistente a contaminación.

##### - Agua

Para los cultivos de microalgas fue necesario contar con grandes volúmenes de agua para su crecimiento. La fuente de agua para la microalga fue agua destilada. La relación de agua para el presente proyecto fue de 3,5 L de agua destilada por cada FBR, para un total final de 17,5 L.

##### - Nutrientes

Para la producción de biomasa de microalgas es necesario tener en cuenta el tipo de alga a utilizar debido a que tienen diferente comportamiento frente a los diferentes tipos de nutrientes. Como en este caso se quiso masificar el cultivo de microalgas, se utilizó un método de cultivo en donde las microalgas alcanzaron su máximo rendimiento productivo. De esta manera, para el cultivo de *Scenedesmus quadricauda*, se utilizó un medio industrial universalmente utilizado para tal microalga, que fue F/2 de Guillard's (Ver composición en Anexos 1), que ha demostrado ser eficiente para el crecimiento de un gran número de microalgas, pero que demanda la utilización de una gran cantidad de nutrientes fundamentales (Stein, 1973).

#### - **Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>)**

Para el cultivo de microalgas, como fuente nutritiva carbonada, se utilizaron volúmenes de CO<sub>2</sub> a presión y flujo determinado proveniente de un balón comercial de gas CO<sub>2</sub> de 500 gr.

#### - **Material de vidrio**

- Beakers : 50 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Bureta : 25 mL
- Cámara de Neubauer
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Matraces : 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Pipetas : 2 mL, 5 mL
- Probetas : 100 mL, 1000 mL
- Termómetro

#### - **Reactivos**

- Agua destilada
- Alcohol 10%
- Medio de cultivo Guillard
- CO<sub>2</sub>(Gas)
- Fenoltaleína

- Hidróxido de Sodio(0.01M)
  - Hipoclorito de Sodio 2,5%
- **Equipos**
- Balanza analítica electrónica SHIMADZU, AX200
  - Balón de CO<sub>2</sub> 500 gr, CATALYNA CYLINDERS ,válvula tipo CGA 320
  - Bomba de aire 3,5 W ,SUN-SUN ,YT-302
  - Regulador con Fluómetro WESTERN MEDICA, 3,5 bar / 50 PSI
  - Sistema Fotobioreactor (FBR)
  - Microscopio binocular CARL ZEISS
  - Multiparámetro ExStik II EC500
  - Micropipeta de 10 µl
  - Luxómetro ,EXTECH 401025, 0-5000 lux
- **Otros**
- Soporte para bureta
  - Tubos de ensayo de plástico : 50x15 mL
  - Malla tipo Raschel

### 3.3 MÉTODOS

#### **PRE-CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE LA MICROALGA *S. quadricauda***

Para la preparación del pre-inóculo, se cultivaron microalgas en matraces de 250 mL con medio de cultivo F/2, a pH 7,5 y a una temperatura de incubación de 25 °C, bajo iluminación continua artificial de 3260 Lux. Todo el proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad.

Para la masificación de microalgas a partir del pre-cultivo ( $1,8 \cdot 10^6$  células/mL), una vez que se obtuvo un color verde intenso, además de una densidad de  $4,5 \cdot 10^6$  células/mL, se realizó una resiembra para 250 mL hasta 500 mL de cepa microalgal para finalmente, escalar el cultivo hasta un volumen de 5 L y mantenerlo como cultivo madre .Seguidamente

se inocularon a partir del cultivo madre, alícuotas de 500 mL a cada tubo FBR (5 tubos que en conjunto contuvieron 17,5 L de cultivo). En la tabla 5 se pueden ver los diferentes niveles de cultivo que se realizaron en el laboratorio.

**Tabla N°5.** Niveles de cultivo de microalgas en el laboratorio.

VOLUMEN(mL)	DÍAS DE CULTIVO	INYECCIÓN DE CO <sub>2</sub>	AGITACIÓN
Cultivo stock( 25)	-	-	-
250	5	(-)	Manual
500	5	(-)	Manual
5000	10	(+)	Aireación

El cultivo de 5 L necesitó más días para la producción de biomasa, además de una agitación y consecuente alimentación con CO<sub>2</sub> por espacio de 10 días.

## DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL FOTOBIOREACTOR

En la presente tesis, se diseñó y se construyó un sistema de fotobiorreactores de columna tipo Batch (Discontinuo) a escala de laboratorio así como el estudio de las condiciones de funcionamiento y el consecuente consumo en la utilización del CO<sub>2</sub> como nutriente en los cultivos de microalgas. Las condiciones de diseño definidas para este sistema fueron caracterizadas de acuerdo a las necesidades mínimas de construcción, mantenimiento y gasto energético.

### - Diseño de los tubos fotobiorreactores

Para la selección adecuada del material de diseño, específicamente para los tubos fotobiorreactores, se necesitaban condiciones en cuanto a transparencia se refiere, para así lograr la máxima radiación solar a los elementos de cultivos (microalgas son organismos altamente fotosintéticos) pero a la vez evitar fenómenos de despolimerización (degradación de plásticos por influencia de la exposición solar) incrementando la vida útil de los mismos. Para tal fin, se consideró como material idóneo al cristal debido a sus características de resistencia a altas temperaturas y transparencia, pero por motivos de tiempo de construcción y gasto económico relativamente alto, se decidió reemplazar el cristal por policarbonato, material que además de las características antes mencionadas como material

idóneo para la estructura de los tubos del sistema, permite el paso de la radiación solar en el rango visible, donde se encuentran las longitudes de onda que tienen papel fundamental en los procesos fotosintéticos de las microalgas.

La forma de los tubos fotobioreactores tuvieron que ser diseñados de forma adecuada para permitir la incidencia de la radiación solar a la mayor parte del cultivo, así como proporcionar la limpieza, manejo, distribución lo más homogénea posible e incremento de producción del cultivo. Es por eso que se diseñaron estructuras de forma cilíndrica con base en forma cónica.

El sistema FBR propuesto consistió en una serie de cinco tubos fotobioreactores concéntricos dispuestos en paralelo, capaces de contener un volumen de 20 L de cultivo como máximo. Para empezar, se diseñaron tubos cilíndricos de entre 60 y 50 cm de largo con fondo cónico entre 7 cm y 9,5 cm de diámetro; la parte superior contuvo una tapa circular con un pequeño orificio para la salida de CO<sub>2</sub>. Todo esto fue calculado para un volumen total entre 17 y 20 L de capacidad. El sistema contó con cinco tapas circulares de 9,8 cm de diámetro cada una también del mismo material, con una altura de 2 cm y un orificio de 0,5 cm para la salida del exceso de gases.

Se dimensionó el FBR cumpliendo con las normas heurísticas y criterios para diseño de equipos de proceso de la forma:

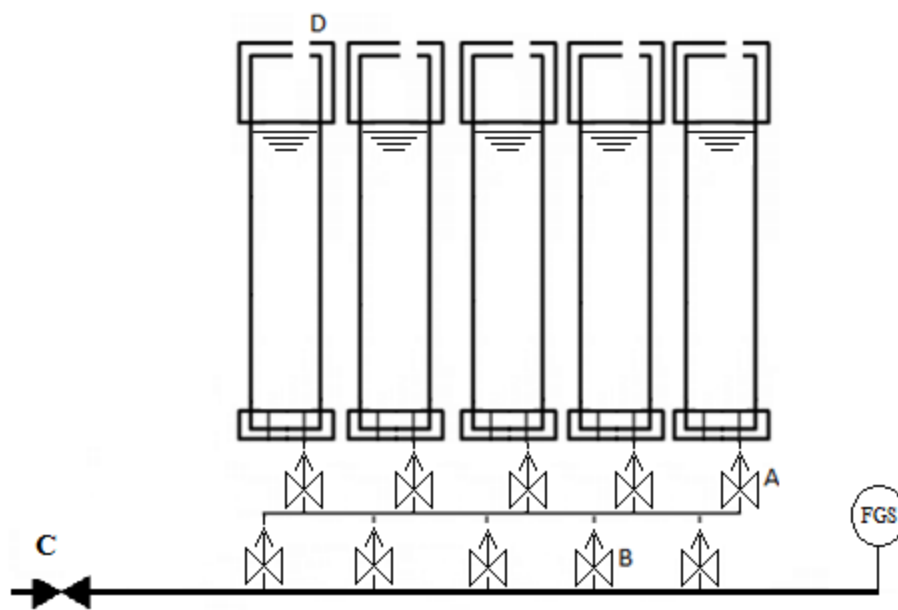
$$\frac{H}{D} = \frac{6}{1}; \quad \text{donde H representa la altura y D el diámetro de los tubos.}$$

Antes de comenzar la parte experimental, los tubos fotobioreactores se limpiaron para eliminar los posibles residuos de construcción y suciedad. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada y para su esterilización, fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % y con etanol, finalmente fueron vaciados y enjuagados con agua estéril (Sánchez *et al.*, 2002).

El funcionamiento y desempeño de los fotobioreactores fueron estudiados luego del llenado del inóculo de algas y bajo las condiciones de cultivo realizadas para tal fin. Se usaron como inóculos iniciales las concentraciones previamente preparadas como pre-inóculo a una concentración de  $4,5 \cdot 10^6$  células/mL por cada tubo FBR.

- Diseño del sistema de distribución y control de CO<sub>2</sub> y aire

Para la alimentación de CO<sub>2</sub> del FBR, se utilizaron un total de 35 cm de manguera transparente de diámetro 0,2 cm para cubrir la distribución de CO<sub>2</sub> para todo el sistema; cada uno de los tubos llevó una válvula de cierre y/o apertura del gas en mención; así como también a cada tubo se le acopló una válvula de cosecha y/o toma de muestra para su posterior evaluación experimental.

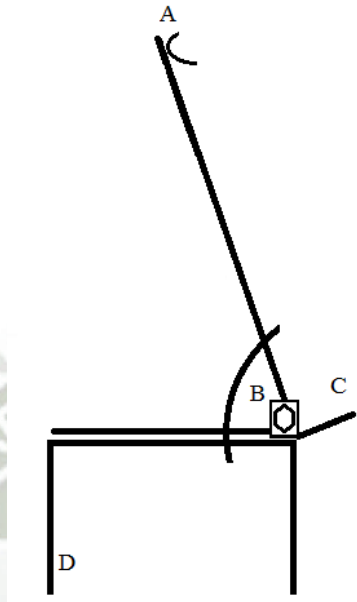


**Fig N°15.** Esquema del sistema de distribución de CO<sub>2</sub> del FBR.

Donde (A) representa las válvulas de salida para tomar muestras y/o cosecha de las microalgas por cada tubo. (B) Son las válvulas reguladoras de ingreso de flujo de CO<sub>2</sub> para cada tubo. (C) Es la válvula auxiliar cerrada de salida. (D) Orificio de 0,5 cm por donde puede escapar el exceso de CO<sub>2</sub> inyectado al sistema y que no consume la microalga.

- Diseño del sistema de soporte del FBR

Para el soporte del sistema FBR se tuvo en cuenta la forma de los tubos, tamaño y peso de los mismos con y sin contenido microalgal antes de realizar la parte experimental.



**Fig N°16.**Esquema de perfil del sistema de soporte de los tubos del FBR.

(A) Estructura en semicircular de 9,8 cm de diámetro. (B)Regulador del ángulo de inclinación del sistema que va de 45° hasta 90°. (C)Base de los tubos. (D) Pie del sistema de soporte del FBR.

### ACONDICIONAMIENTO EXPERIMENTAL DEL FBR

El sistema de fotobioreactores propuesto, se caracterizó por ser un sistema cerrado, con un desarrollo masivo de microalgas y expuesto a la luz solar. Estas pruebas se realizaron en la semana del 13 de Agosto del presente año. En función de estos condicionantes se seleccionaron los parámetros para el seguimiento continuo del proceso:

- pH

Para el registro del pH, se hizo uso de un medidor multiparámetro modelo ExStik II EC500 y se siguió el siguiente procedimiento para su lectura cada 12 horas (0 horas, 10 horas y 22 horas) por un lapso de 9 días:

Colocar la punta del electrodo en uno de los tubos del FBR, hacer una breve agitación del medidor multiparámetro y dejar unos minutos para que la medición se estabilice y muestre un valor en pantalla.

- Intensidad luminosa

Un aspecto muy importante que se tuvo en cuenta a la hora de llevar a cabo el cultivo de *S. quadricauda* fue el efecto que puede producir las grandes variaciones de intensidad de luz que sufren las células al ser expuestas por primera vez al pre-inóculo (contenido en el FBR) al nuevo medio. Es por eso que para evitar estas variaciones, se decidió trabajar con *S. quadricauda*, la cual es una especie resistente a las variaciones bruscas de intensidad luminosa; también se instaló una malla tipo Raschel al 35% de protección solar para evitar fotoinhibición de las algas puesto que la intensidad luminosa en Arequipa es muy fuerte; esto en relación a que anteriormente se trabajó en condiciones sin sombra alguna obteniéndose resultados negativos. La intensidad luminosa se midió en Lux con la ayuda de un luxómetro. Se aprovechó las características del diseño del FBR en relación al ángulo de 45 grados, lo que le otorgó al sistema mayor área de contacto con el sol.

- Temperatura

Al igual que el pH, para la lectura de la temperatura se hizo uso del medidor multiparámetro modelo ExStik II EC500 y se siguió el siguiente procedimiento para el registro para las 3 muestras realizadas por día (0, 10 y 22 horas) por un lapso de 9 días: Colocar la punta del electrodo en uno de los tubos del FBR, hacer una breve agitación del medidor multiparámetro y dejar unos minutos para que la medición se estabilice y muestre un valor en pantalla.

- Agitación

La agitación fue otro parámetro físico muy importante para que el cultivo se desarrolle con éxito, el cual, fue generado por el burbujeo generado por la inyección de CO<sub>2</sub> al sistema. Al originar movimiento del medio en el sistema, indirectamente se van a producir muchos efectos positivos en el cultivo, principalmente se va a lograr una distribución totalmente homogénea de las microalgas y de los nutrientes, evitando la existencia de zonas muertas.

- CO<sub>2</sub> como nutriente carbonado para *S.quadricauda*

La fuente principal de carbono fue el CO<sub>2</sub>; difunde muy rápidamente del agua al interior celular. Para el tipo de diseño propuesto en este sistema, la entrada de CO<sub>2</sub> estuvo acoplada a la entrada de CO<sub>2</sub> a una velocidad de flujo del 100%, 50 % y 2% para determinar la eficiencia del desarrollo de la microalga. El suministro de CO<sub>2</sub> se realizó durante el día, debido a que la reacción fotosintética de la microalga transcurre durante las horas de luz. En la noche como cualquier organismo aeróbico, las algas produjeron CO<sub>2</sub> mediante la respiración y no fue necesario el suministro de CO<sub>2</sub>.

**Tabla N°6.** Parámetros de diseño del sistema FBR

CONDICIONES ÓPTIMAS DE DISEÑO	PARÁMETROS DE DISEÑO
UBICACIÓN GEOGRÁFICA	Arequipa
CEPA	<i>Scenedesmus quadricauda</i>
MEDIO DE CULTIVO	F/2 Guillard
VOLUMEN DE CULTIVO	17,5 L
FOTOPERIODOS	7 horas luz
TIPO DE ENERGIA	Energía solar
INTENSIDAD LUMINOSA	Luz natural bajo sombra
MEZCLA GASES	CO <sub>2</sub> -O <sub>2</sub>
TEMPERATURA	Gamas de temperaturas de 15 ° a 26°C
AGITACIÓN	Por efecto de la inyección de CO <sub>2</sub>
MATERIALES	Policarbonato, mangueras, Fierro estructural, tornillería
SISTEMAS DE CONTROL Y MEDICIÓN	Electrónicos para pH ,temperatura e intensidad luminosa Neumáticos para flujo de CO <sub>2</sub>

### DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO MICROALGAL EN EL SISTEMA FBR

Como paso inicial, los tubos fueron cargados con aproximadamente 500 ml de inóculo inicial de *S.quadricauda* ( $4,5 \cdot 10^6$  células/mL), 7 ml de medio de cultivo f/2 (2ml/L) y fue completado el resto con agua destilada hasta un volumen final de 3,5 L para cada tubo. El

sistema FBR se mantuvo a temperatura ambiente y expuesto a la luz solar con incidencia solar de radiación directa durante aproximadamente 10 horas diarias.

Se midió la densidad poblacional de las microalgas para la elaboración de la curva de crecimiento microalgal en presencia y ausencia de CO<sub>2</sub> (biomasa vs tiempo). Para ello se utilizó el método hematocitómetro mediante la cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad, haciendo recuentos cada 12 horas y con sus respectivas repeticiones.

El procedimiento se detalla a continuación:

Se coloca un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer en forma horizontal. Haciendo uso de una micropipeta se toman 10 µL de muestra de microalga y se coloca la punta de la micropipeta en el borde del cubreobjetos en el extremo de la cámara de Neubauer y se depositan los 10 microlitros de muestra. Dejar reposar la muestra por 2 minutos. Se coloca la cámara de Neubauer en el microscopio y ubicar el cuadrante central donde se va a hacer el recuento celular.; realizar el conteo de células de los 25 cuadrados pequeños para obtener mayor precisión. Luego, para obtener el número de células por mililitro(N), multiplicar el número de células contadas en la cámara (NC) por 10<sup>2</sup>(Factor de corrección para convertir a mm<sup>3</sup>) y por 10<sup>3</sup> (Factor de corrección para convertir a ml).

$$N = (NC) (10^2) (10^3) \quad (2)$$

## **DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE CO<sub>2</sub>**

Como parte experimental, se determinó el consumo de CO<sub>2</sub> por valoración química, neutralizando el ácido carbónico que se encuentra en equilibrio con el CO<sub>2</sub> libre, siguiendo los procedimientos de análisis del manual de prácticas de Operaciones Unitarias de la Universidad Autónoma Metropolitana de México siguiendo la norma EPA y WHO ( Vizcarra, 2010).

El CO<sub>2</sub> disuelto en agua da lugar al llamado equilibrio carbónico, de gran importancia en la química del agua:

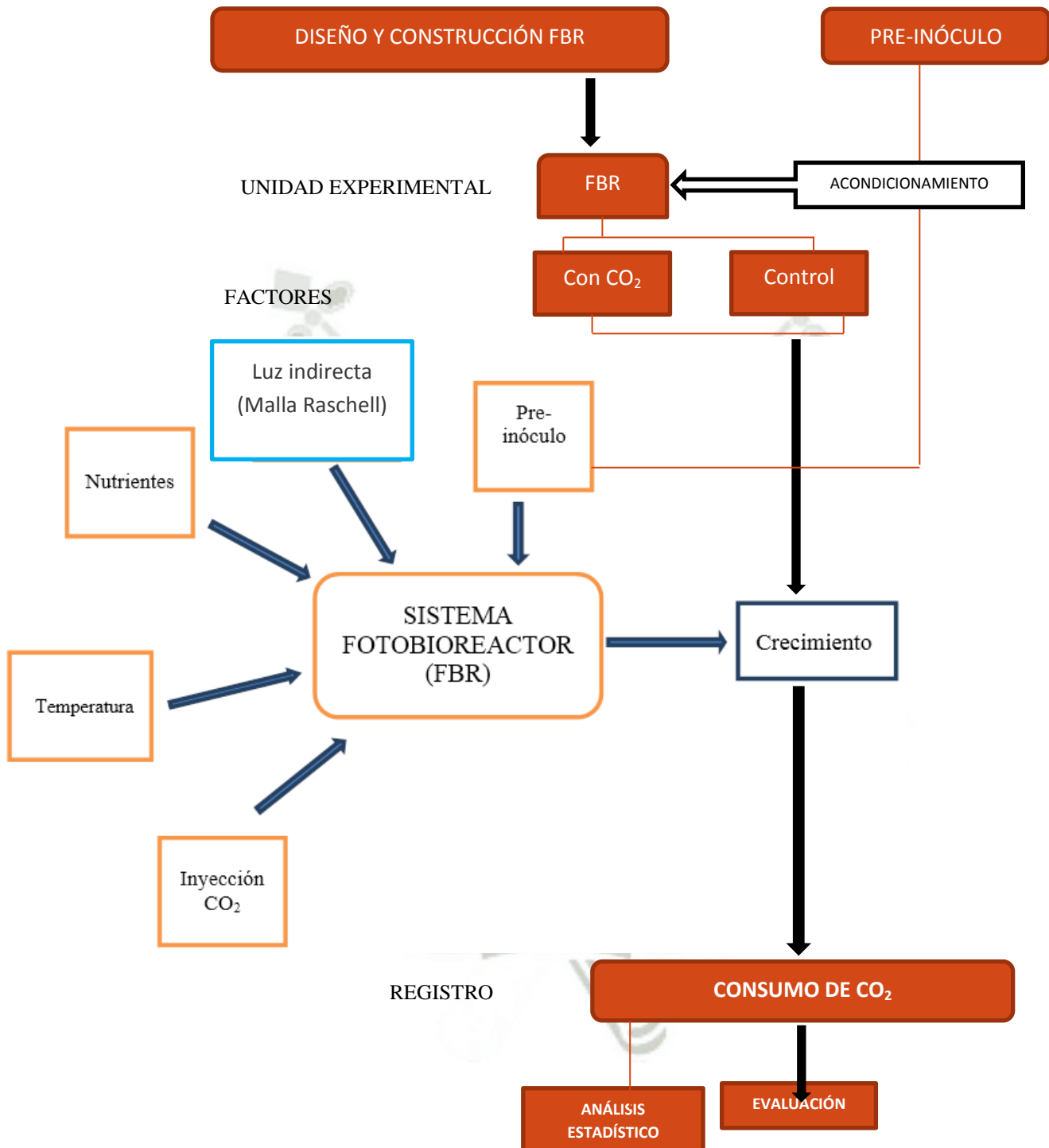


- Modo operatorio

En una probeta de 50 mL, se introducen 10 mL de la muestra de agua. Se agregan 2 gotas de Fenolftaleína como indicador del punto final, si aparece una coloración rosada no hay  $\text{CO}_2$  en la muestra. Si por lo contrario (es lo más común) no hay coloración, se valora con una concentración conocida de NaOH hasta la aparición de un color rosado que desaparece al cabo de 3 minutos.



### 3.4 FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES

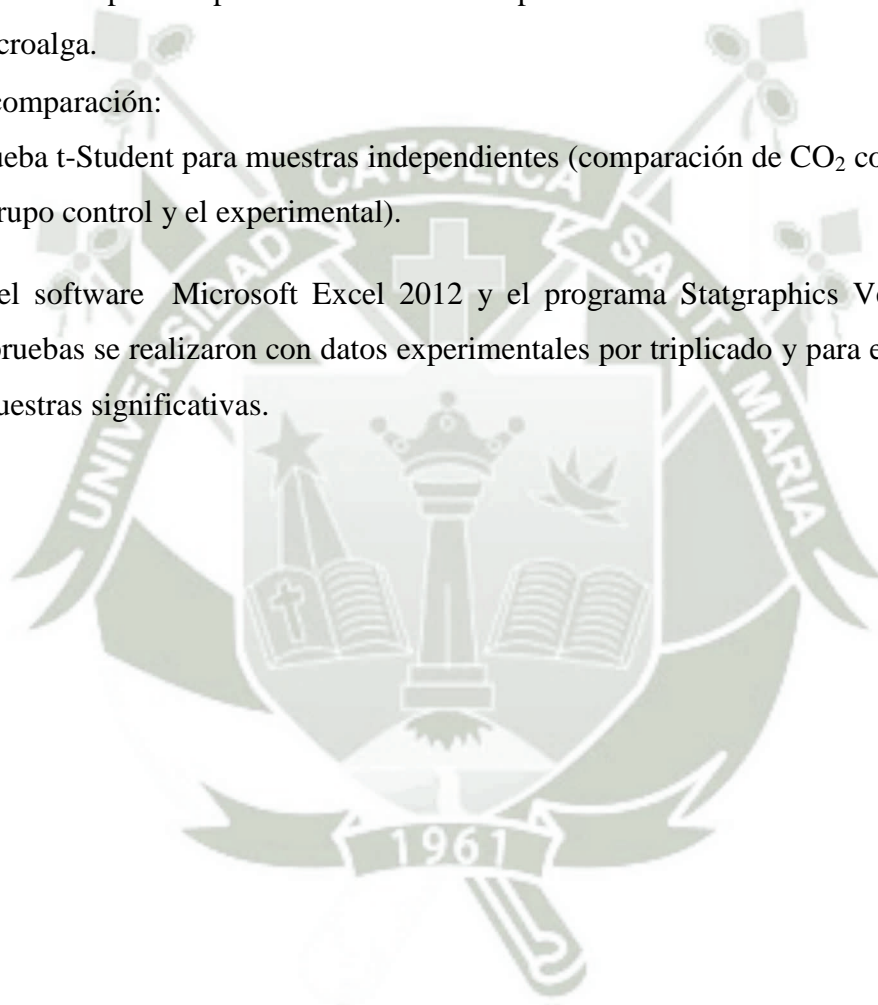


### 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De acuerdo con los resultados obtenidos, para el respectivo análisis estadístico se realizaron las siguientes pruebas:

- Estadística descriptiva: media, desviación estándar, valores máximos y mínimos) para todos los registros realizados en la parte experimental.
- Diagrama de dispersión para determinar el comportamiento de la curva de crecimiento de la microalga.
- Para la comparación:
  - Prueba t-Student para muestras independientes (comparación de CO<sub>2</sub> consumido en el grupo control y el experimental).

Se utilizó el software Microsoft Excel 2012 y el programa Statgraphics Versión 16.1. Todas las pruebas se realizaron con datos experimentales por triplicado y para el análisis se tomaron muestras significativas.

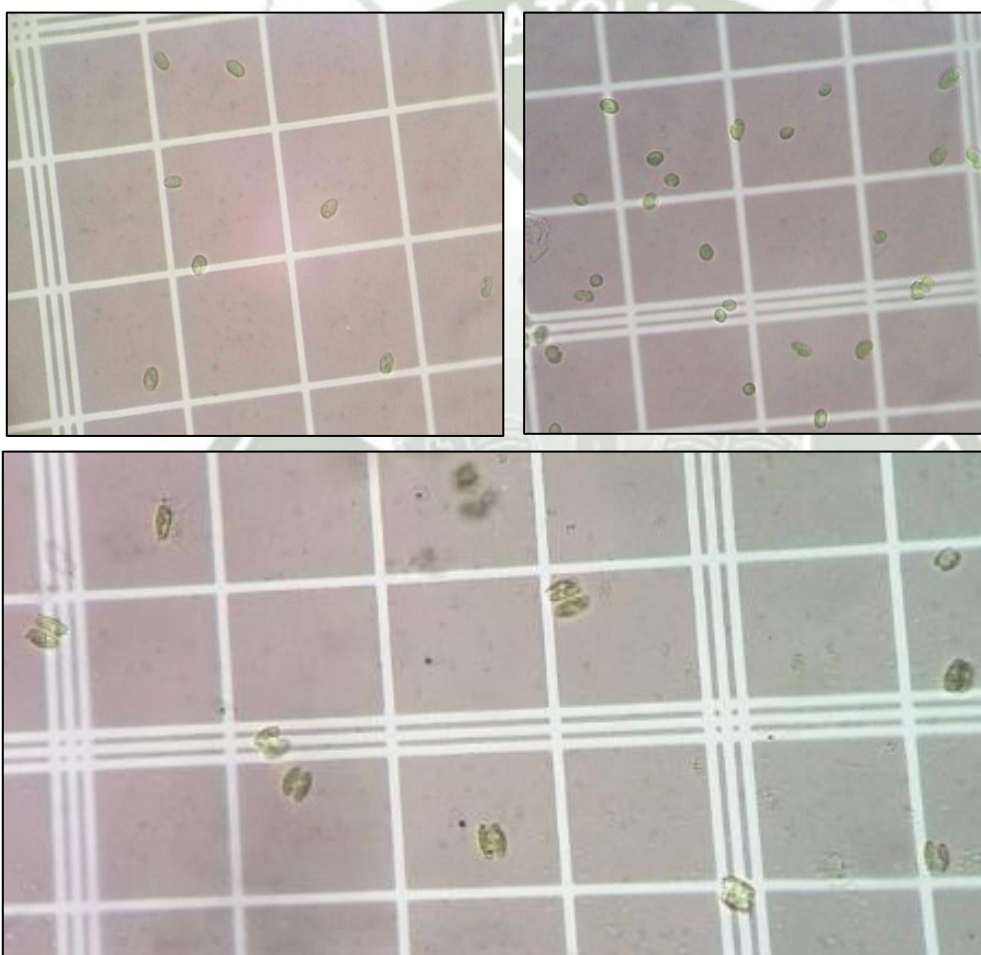


## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

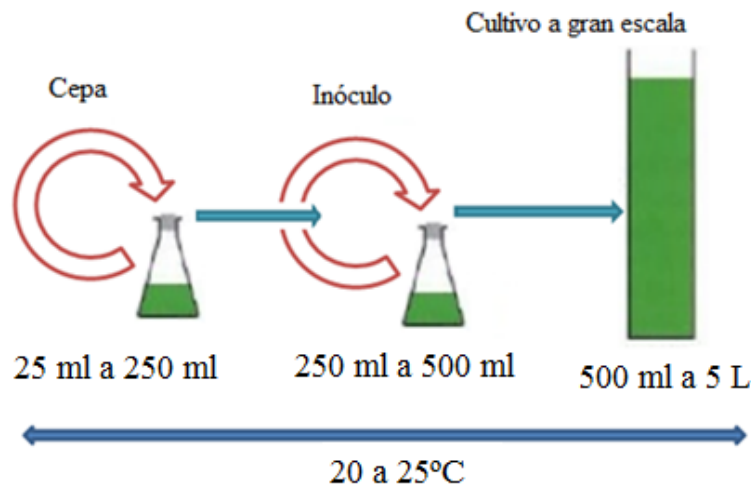
#### 4.1 PRE CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE *Scenedesmus quadricauda*

Para la determinación de la concentración de microalgas en suspensión, se procedió al conteo celular utilizando una cámara de Neubauer de 0,100 mm de profundidad; para tal efecto, se extrajo una muestra y se procedió al conteo.



**Fig N°17** .Masificación del pre-inóculo de la microalga *S. quadricauda* en el FBR<sup>1</sup>.

1. Observación al microscopio con objetivo de 100X a partir de una muestra de 10  $\mu$ L



**Fig N°18.** Esquema del escalamiento del cultivo de *S. quadricauda*

La cepa de la microalga fue inicialmente inoculada en 25 mL a partir de un stock previamente obtenido; se fue aumentando tanto de medio de cultivo como de concentración de microalgas hasta obtener una densidad celular final de  $4,5000 \cdot 10^6$  células/ml en 5 L de cultivo.

#### 4.2 CONDICIONES FINALES DE DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL FBR

Para el presente trabajo de tesis, inicialmente se tomaron rangos de medidas teóricas para el diseño y construcción del FBR que de acuerdo con las condiciones previas de experimentación y mejoras en el diseño final, se tomaron finalmente tubos cilíndricos de 57 cm de largo con fondo cónico de 7 cm de largo y 9,5 cm de diámetro; la parte superior de los tubos contaron con una tapa circular de 2,5 cm de largo con un pequeño orificio para la salida de CO<sub>2</sub>. Todo esto calculado para un volumen total final de 20 L. El esquema del diseño final se puede apreciar en la figura 19.

En lo que respecta al dimensionado correspondiente a la altura, finalmente se diseñó el FBR cumpliendo con los factores de escalamiento de la forma:

$$\frac{H}{D} = \frac{6}{1} \quad (4)$$

Donde a partir de un diámetro (D) de 9,5 cm tenemos la relación siguiente:

$$\frac{H}{D} = 6 \text{ a } 1 = 6(D)$$

$$H = 6(9,5)$$

$$H = 57 \text{ cm de altura}$$

La capacidad volumétrica para una altura de 57 cm de cada tubo se diseñó para un volumen de 4 L como máximo, conteniendo como volumen total para los cinco tubos de 20 L pero en la parte experimental se decidió trabajar con un valor real de 3,5 L (valor establecido según pruebas pre-experimentales realizadas previamente) para un volumen final de 17,5 L (Adaptado de José García, 2010). La capacidad volumétrica se hizo siguiendo el dimensionado siguiente:

$$V_{\text{FBR}} = 5(V_{\text{Tubo}}) \quad (5)$$

Considerando un volumen para cada tubo del FBR de 3,5 L:

$$V_{\text{FBR}} = 3,5 \text{ L} = 0,035 \text{ m}^3$$

Entonces la capacidad volumétrica de cada tubo deberá ser mayor o igual a  $0,035 \text{ m}^3$

$$V_{\text{FBR}} = \pi r^2 h_{\text{Tubo}} \geq 0,035 \text{ m}^3 \quad (6)$$

Reemplazando en ecuación (6) tenemos:

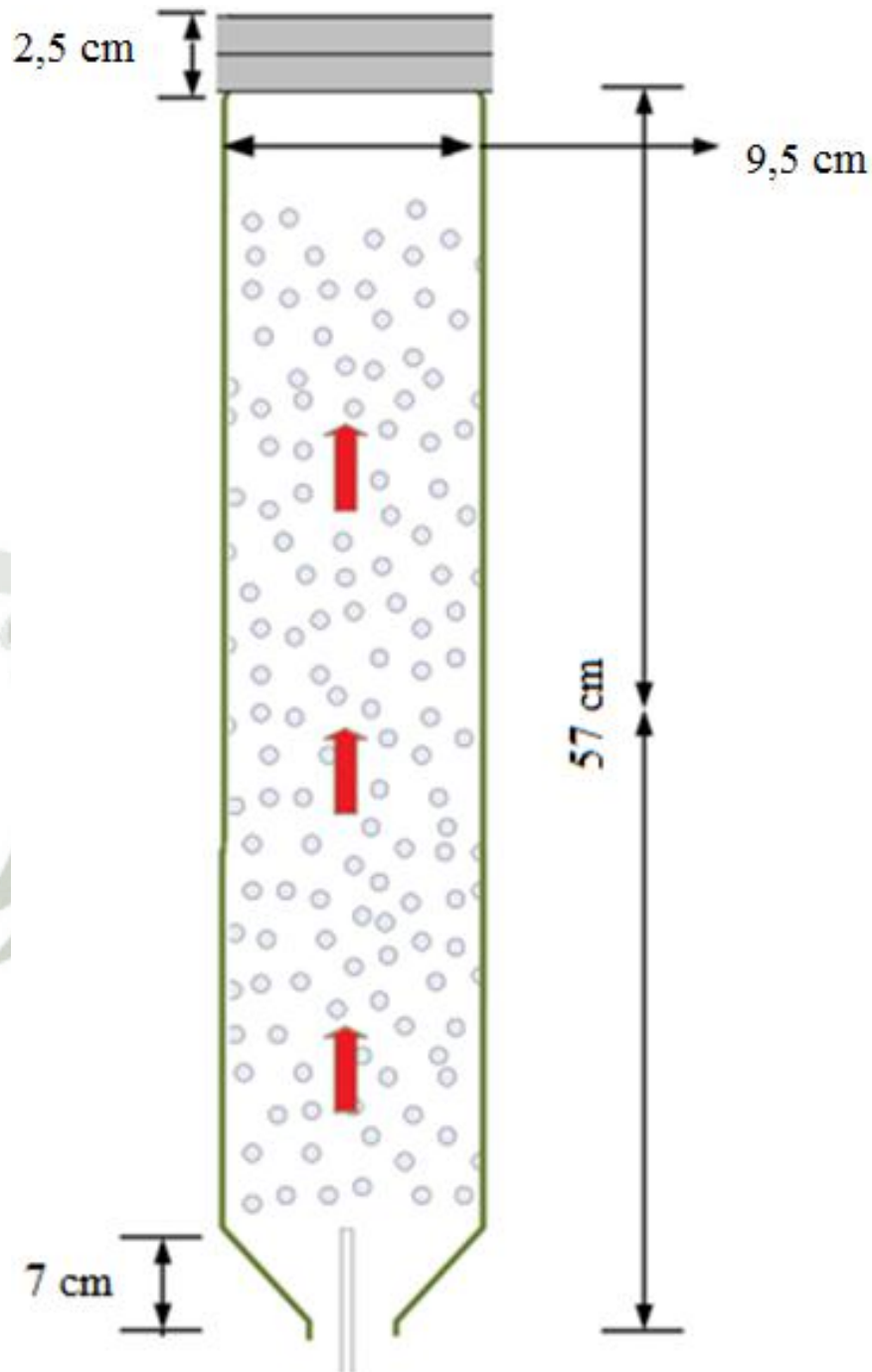
$$V_{\text{FBR}} = (3,14) (4,75)^2 (57) \geq 0,035 \text{ m}^3$$

$$V_{\text{FBR}} = 0,040 \text{ m}^3 \geq 0,035 \text{ m}^3$$

Ahora reemplazando datos en la ecuación (5) para el volumen final total:

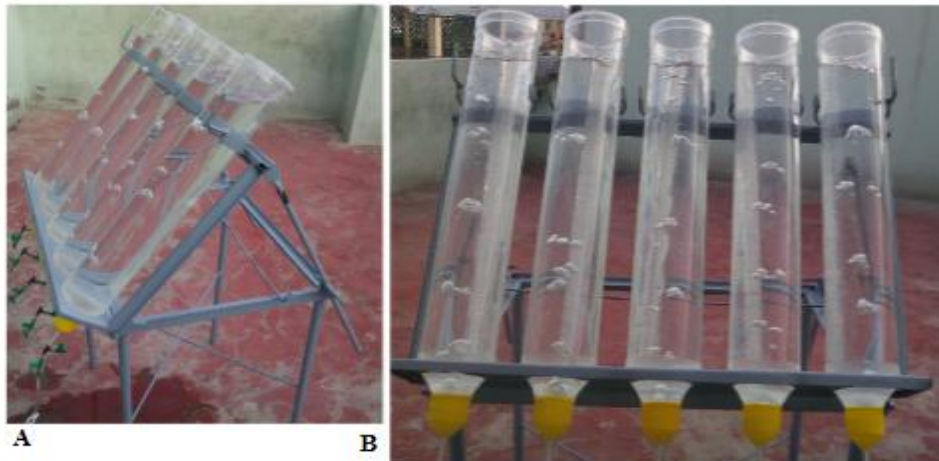
$$V_{\text{Total}} = 5(V_{\text{Tubo}})$$

$$V_{\text{Total}} = 5(0,040) = 0,20 \text{ m}^3$$



**Fig N°19.** Diseño y medidas de cada uno de los tubos fotobioreactores.

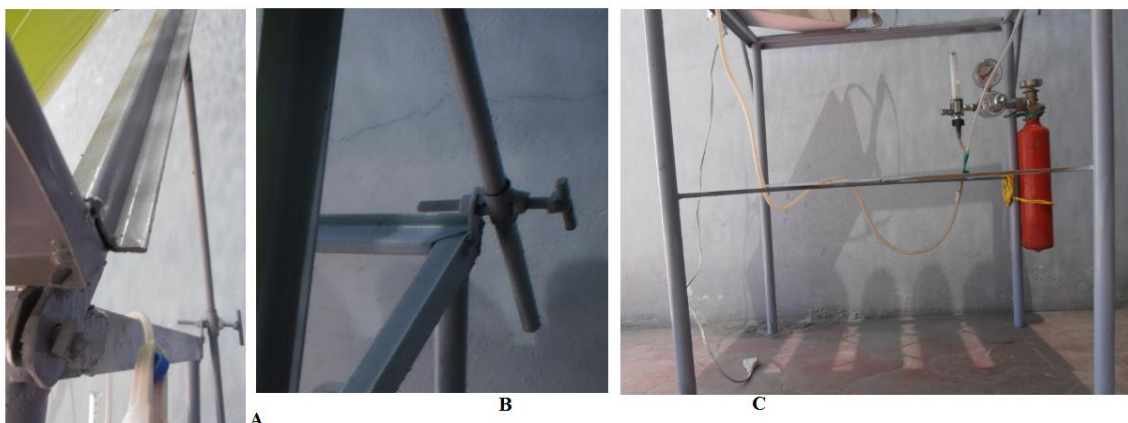
Se puede apreciar en la figura como quedó finalmente el diseño de los 5 tubos fotobioreactores basándose en las necesidades energéticas, condiciones de luz y periodo experimental para el sistema propuesto.



**Fig N°20.** Vistas en perfil (A) y frontal (B) del diseño final del sistema FBR.

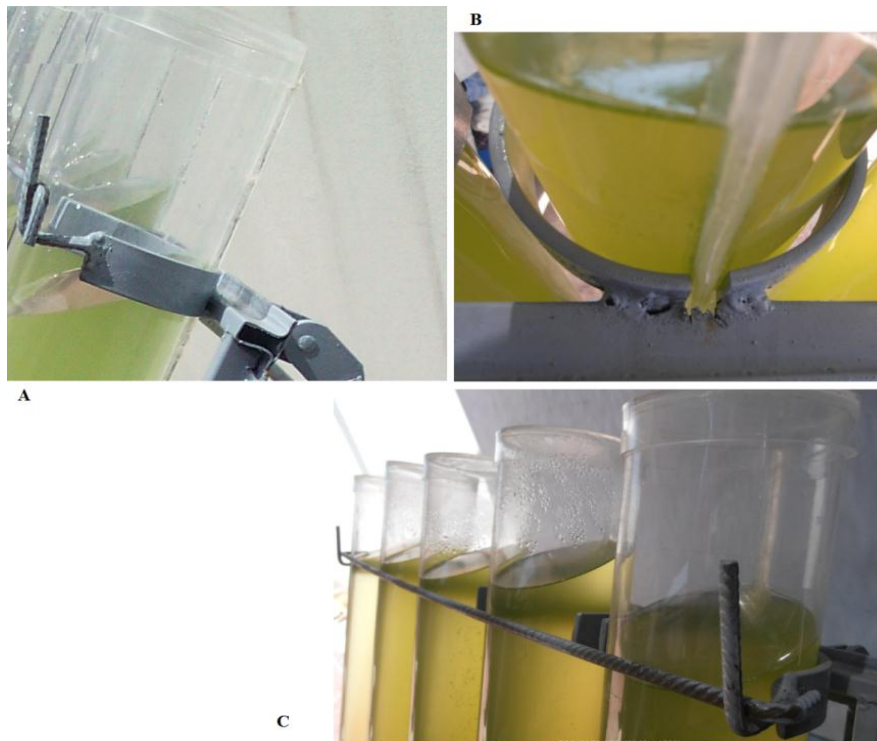
La configuración inicial de funcionamiento del sistema FBR, se puso en marcha solo con agua para poner en marcha al sistema. (A) Sistema de regulación angular de los tubos, el cual consta de una válvula de metal ajustable de 45 hasta 90 grados, según la necesidad del caso, permitiendo así generar una mayor área de contacto con la iluminación según sea la necesidad. (B) Se muestran en la base de los tubos unos capuchones de color amarillo los cuales descansan en una base rectangular y conceden el ingreso del sistema de alimentación conformado por  $\text{CO}_2$ ; la separación entre los tubos fue de 4 cm.

Un aspecto importante del diseño del Fotobioreactor fue el hecho de reducir el efecto de saturación de luz de la fotosíntesis, así como la inclinación de los tubos que se estableció en  $45^\circ$  por la posición del sol en la zona ecuatorial; el ingreso de luz por medio de las paredes de los tubos fue suficiente para realizar la fotosíntesis ya sea en horas de la mañana o en las horas de la tarde.



**Fig N°21.** Sistema de soporte para los tubos.

- A. Bisagras que permiten cambiar el ángulo de inclinación de los 5 tubos al mismo tiempo.
- B. Regulador que permite variar el ángulo de inclinación de los tubos desde 90 hasta 45 grados dependiendo del área de contacto con el sol.
- C. Soporte del sistema FBR.

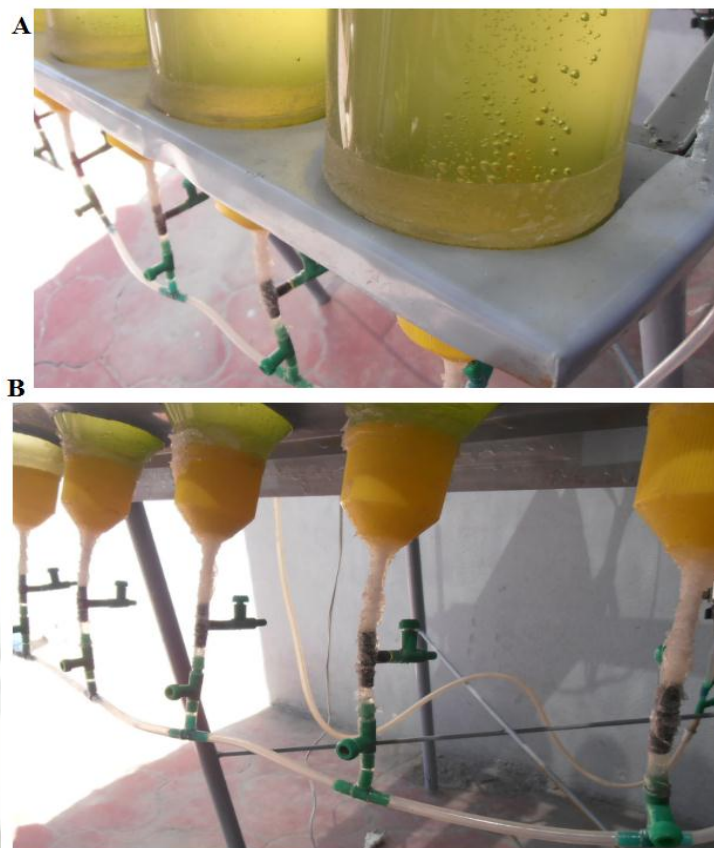


**Fig N°22.** Fotografías del sistema de soporte de los tubos.

A. Estructura semicircular de 9,8 cm de diámetro que sirve como soporte y anclaje exterior para los tubos. B. Vista superior frontal del mismo que cuenta con una ranura de 0,45 cm para fijar cada tubo. C. Vista frontal del sistema FBR donde se aprecia una barra que cumple la función de ajuste frontal para los tubos.

Con respecto al soporte base de los tubos, se diseñó una base rectangular de 13 cm de ancho x 64 cm de largo, con una separación de 4 cm de separación entre cada tubo y un agujero de 8cm de diámetro para albergar la parte final de cada uno de los tubos.

Finalmente para la parte del control de flujo de  $\text{CO}_2$ , se diseñó un sistema de alimentación, toma muestra y cosecha de los mismos, para lo cual se utilizaron 83 cm de manguera transparente de plástico de 0,55 cm de diámetro. Por cada tubo, se instaló una llave para cosecha de microalgas o toma de muestras de material plástico situado al final de la parte cónica del tubo y una llave de control de flujo de  $\text{CO}_2$  para regular la intensidad de flujo que ingresó a cada tubo del sistema; además se instalaron 2 válvulas de regulación independientes para  $\text{CO}_2$  (Ver Figura 23).



**Fig N°23.** Fotografías de la parte inferior del FBR.

A. Estructura rectangular de la base que conforma el soporte de los tubos, la cual se diseñó según el diámetro de los tubos dejando un espacio de 4 cm de separación entre cada tubo.

B. Se muestra el sistema de alimentación, regulación y agitación de flujo de CO<sub>2</sub> el cual está conformado por 5 pequeñas válvulas de plástico; todas ellas están interconectadas entre sí por medio de uniones en forma de “T”. Cuenta también con 5 válvulas de cosecha y/o muestra para fines experimentales.

### 4.3 ACONDICIONAMIENTO EXPERIMENTAL DEL FBR

#### PARÁMETROS DE pH Y TEMPERATURA EN EL FBR

El pH del sistema fue el que determinó las concentraciones de iones hidrógeno e hidroxilo del cultivo. Las microalgas dependen directamente del valor de pH, y en función de la especie tendremos mayor o menor grado de respuesta a variaciones del pH del medio. El pH promedio para *S. quadricauda* según la experimentación fue de 8,2.

Según la teoría, un descenso a un valor de pH 5 a menos, puede ser debido a una ausencia prolongada de actividad fotosintética originada por las condiciones a las que el cultivo está expuesto; en cambio un aumento cercano a 9 o un poco más es más tolerable (como fue el caso en la etapa de acondicionamiento) siempre y cuando esta subida no sea durante mucho tiempo.

**Tabla N°7.** Efecto de la regulación del pH  $\text{CO}_2$  alimentado al sistema FBR

pH	ESPECIE PREDOMINANTE
pH > 10	Iones carbonatos
pH = 8	Bicarbonatos
pH < 4,5	Dióxido de carbono

La mejor técnica para la regulación del pH fue mediante el uso del  $\text{CO}_2$  que sirvió a la vez como fuente de carbono y agitación al sistema (el suministro de  $\text{CO}_2$  aumenta en grandes cantidades la productividad de los cultivos de la microalga) para el sistema de cultivo. No se utilizaron compuestos ácidos ni básicos para la regulación del pH, ya que, aunque se consiga recuperar el nivel deseado, se está introduciendo en el sistema sustancias químicas nada beneficiosas para las algas; son ellas mismas que mediante su actividad fotosintética regularon el pH.

De los resultados obtenidos, respecto a las fluctuaciones del pH, éstas se hallan dentro de lo normal (6 a 8) observándose un considerable incremento del pH de los cultivos que están creciendo activamente debido a que la fotosíntesis permite el consumo del  $\text{CO}_2$  y posibilita la presencia de carbonatos. Asimismo, es posible observar que los cultivos al empezar a entrar en fase estacionaria incrementaron la presencia del pH.

El efecto del  $\text{CO}_2$  en la tasa de crecimiento en relación al pH fueron notorios en un 50% indicando el consumo del  $\text{CO}_2$  por las microalgas. La dosificación periódica del  $\text{CO}_2$  fue realizada mediante la inyección de  $\text{CO}_2$  a partir de un balón de 500 g por espacio de 7 horas/día, permitiendo la rápida disminución del pH y su posterior recuperación como producto de la asimilación del  $\text{CO}_2$  por las algas.



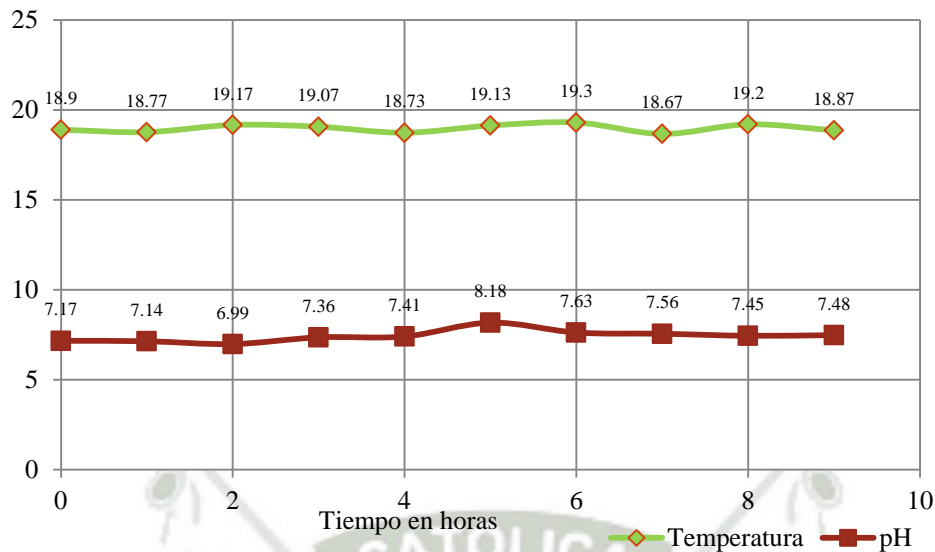
**Fig N°24.** Fotografía del funcionamiento del FBR.

Para los registros de pH y temperatura se destapó el tubo y se procedió a medir el pH y la temperatura con el multiparámetro.

Las fluctuaciones de pH observadas en el crecimiento de *S. quadricauda* fueron características de cultivos creciendo activamente ya que dichas fluctuaciones obedecen a la dinámica de consumo del carbono inorgánico ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) por las algas durante el proceso fotosintético siendo más alto el pH conforme las algas consumen más  $\text{CO}_2$  libre.

Por tanto, el mantenimiento de las condiciones neutrales de pH por la adición de  $\text{CO}_2$  se debió a la existencia del sistema  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  presentes en el medio, que actuó como un buffer o amortiguador impidiendo que el medio de cultivo se acidifique o basifique bruscamente. En consecuencia basado en éste principio, se entiende porqué el medio se tornó básico durante la fotosíntesis y ácido durante la respiración.

Respecto a la temperatura de los cultivos, éstos variaron poco, siguiendo las fluctuaciones de la temperatura ambiental, así como la continua agitación y las condiciones cerradas del sistema FBR. La actividad biológica de *S. quadricauda* respondió positivamente a un aumento de la temperatura; el rango de temperatura se mantuvo entre los 16 y 19 grados. Cabe señalar que distintas especies de microalgas presentan distintas tolerancias a la temperatura, encontrándose cepas que no superan los  $22^\circ\text{C}$  y otras que soportan hasta los  $35^\circ\text{C}$ ; en el caso de *S. quadricauda*, se sabe que puede tolerar hasta  $25^\circ\text{C}$  de temperatura en condiciones extremas.



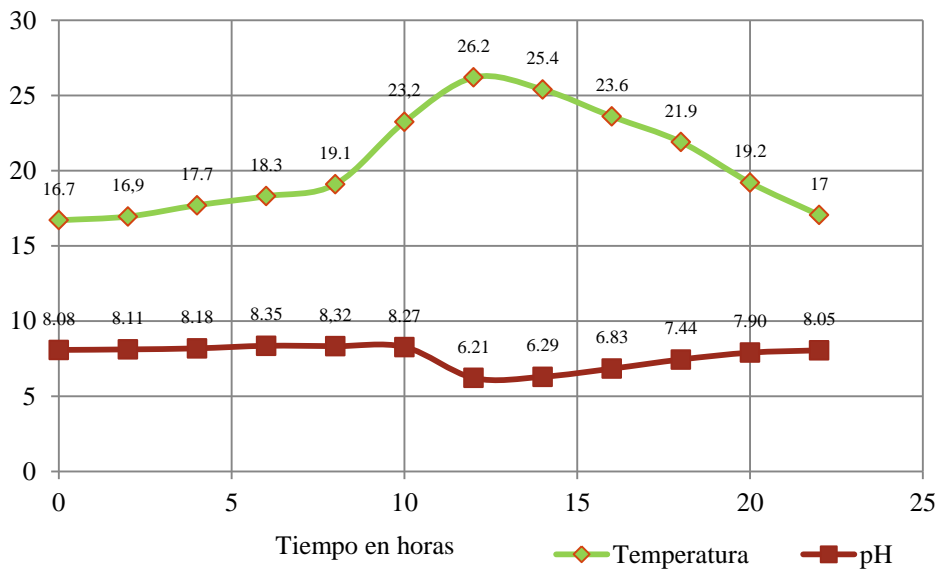
**Fig N°25.** Comparación y seguimiento de la variación de la temperatura y pH del cultivo de 9 días de *S.quadricauda*.<sup>1</sup>

1. Las variaciones de la temperatura se deben fundamentalmente al calentamiento diurno del sistema por la incidencia de la radiación solar y, el correspondiente enfriamiento nocturno en ausencia de esta.

En la figura se puede observar que existen rangos de fluctuación que van de 18,7°C hasta los 19,1 °C como máximo. Cabe resaltar que los valores antes mencionados están dentro de los rangos aceptables de experimentación para el cultivo de *S.quadricauda* y se puede observar que la temperatura promedio crecimiento se encuentra sobre los 19°C. Las medidas de la temperatura se realizaron en la semana del 13 de Agosto del presente año. Las medidas de pH, tuvieron igualmente rangos de variación de 7,14 hasta 8,18 como máximo; obteniéndose un pH de 7,4 como promedio para el desarrollo de la microalga.

Los registros de la medición del pH en el sistema FBR para 24 horas se representaron gráficamente (Ver Figura 26); los valores medidos mostraron variaciones significativas entre los valores máximos y mínimos correspondientes a los periodos día y noche respectivamente.

Los valores iniciales de pH mostraron una tendencia creciente hasta alcanzar un valor máximo de 8,34 con una evolución caracterizada por oscilaciones diarias correspondientes a los periodos diurno y nocturno.



**Fig N°26.** Variación del pH y temperatura del cultivo de 24 horas de *S. quadricauda* en el FBR.

En el seguimiento de temperaturas establecidas en el cultivo de *S. quadricauda*, se puede apreciar en la figura que alcanza una temperatura máxima de 26,2°C al mediodía; hora en la que el calor del día alcanza su máximo rango de temperatura, descendiendo a partir del mismo por la tarde y noche. El descenso abrupto del pH a las 10 horas, corresponde a la fase de adaptación que sufrió la microalga al ser alimentado con CO<sub>2</sub> el cual, es un regulador inherente del sistema FBR.

### INTENSIDAD LUMINOSA

La radiación solar fue otro factor fundamental para el buen desarrollo del cultivo de las microalgas y estuvo muy relacionada con la intensidad de luz que rodeaba al sistema FBR. Un exceso de intensidad luminosa es decir, expuesto directamente a los rayos del sol, produjo en el sistema desarrollo bacteriano, altas tasas de respiración durante la noche y pérdida de biomasa, además de la influencia del fenómeno de fotoinhibición lo que limitó el desarrollo de la microalga en el FBR.

Es por eso que se decidió trabajar con una malla Raschel al 35% de sombra lo cual le proporcionó excelentes condiciones de crecimiento con una radiación solar de 51200 Lux como máximo.

**Tabla N°8.** Comparación del desarrollo de *S.quadricauda* en sombra al 35% y sin sombra expuesto directamente a los rayos solares.

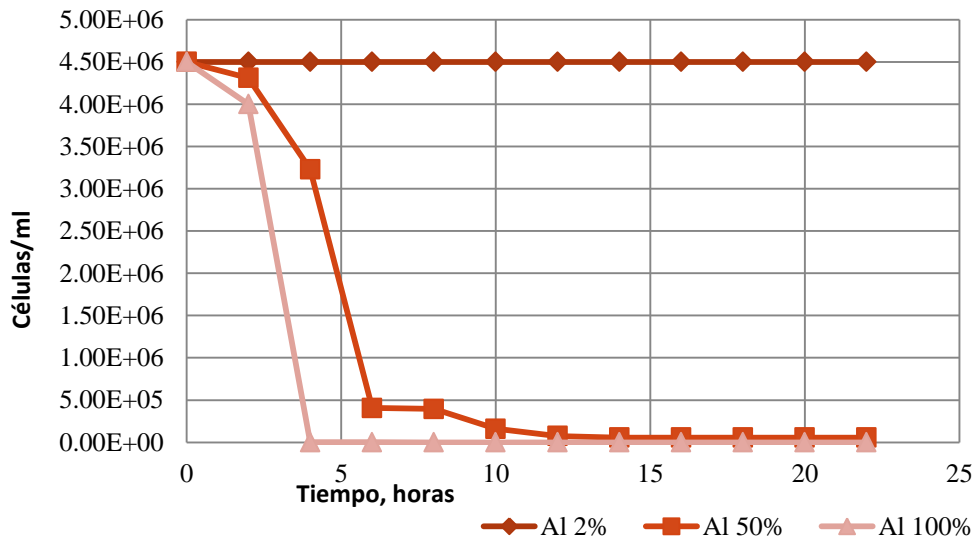
Tiempo (Horas)	Sin Sombra		Sombra al 35%	
	Células/mL	Lux (Lumen/m <sup>2</sup> )	Células/mL	Lux (Lumen/m <sup>2</sup> )
0	4,5•10 <sup>6</sup>	0,03	4,5•10 <sup>6</sup>	0,03
2	4,5•10 <sup>6</sup>	0,03	4,5•10 <sup>6</sup>	0,03
4	4,5•10 <sup>6</sup>	0,03	4,5•10 <sup>6</sup>	0,03
6	4,5•10 <sup>6</sup>	72200	4,5•10 <sup>6</sup>	63200
8	4,5•10 <sup>6</sup>	103500	4,5•10 <sup>6</sup>	29500
10	2,5•10 <sup>6</sup>	113400	4,5•10 <sup>6</sup>	41400
12	1,0•10 <sup>6</sup>	158000	4,5•10 <sup>6</sup>	51200
14	8,4•10 <sup>5</sup>	113500	4,5•10 <sup>6</sup>	25600
16	6,6•10 <sup>5</sup>	16200	4,5•10 <sup>6</sup>	5320
18	6,6•10 <sup>5</sup>	895	4,5•10 <sup>6</sup>	252
20	6,6•10 <sup>5</sup>	0,05	4,8•10 <sup>6</sup>	0,05
22	6,6•10 <sup>5</sup>	0,03	4,8•10 <sup>6</sup>	0,03

Según la tabla, no se utilizaron los 9 días de experimentación; la prueba se realizó en un día con el único objetivo de seleccionar la intensidad luminosa adecuada para la parte experimental, donde claramente se observa que con un cultivo inicial, al ser expuesto directamente a los rayos solares, va disminuyendo en concentración hasta llegar a las  $6,6500 \cdot 10^5$  células/mL; mientras que con la exposición con sombra, el cultivo se mantiene estable. Nótese que la intensidad luminosa final, se redujo un 32%; lo cual se puede concluir que con un nivel de sombra adecuada, se puede mantener y cultivar la microalga sin mayores problemas en comparación al cultivo sin sombra alguna.

### VELOCIDAD DE FLUJO DE CO<sub>2</sub> Y AGITACIÓN DEL FBR

Para el establecimiento de la velocidad de flujo de CO<sub>2</sub>, se hicieron 3 experimentos; primero se alimentó al sistema con una velocidad al 100 % de ingreso de CO<sub>2</sub>, en la segunda prueba se alimentó al sistema al 50% de velocidad de flujo y en la tercera, solo con el 2% de flujo. Los resultados de las pruebas determinaron que el ingreso al 2% obtuvo

resultados satisfactorios en lo referente al mantenimiento de *S.quadricauda*, lo cual sirvió como valioso parámetro para su posterior cuantificación mientras que con un flujo de alimentación al 100 y al 50 % ocasionaron una masiva fotoinhibición provocando la floculación y posterior muerte celular; esto debido al exceso de CO<sub>2</sub> ingresado al sistema lo que generó inestabilidad en el pH.



**Fig N°27.** Comparación de la variación del ingreso de 3 flujos de CO<sub>2</sub> para 24 horas<sup>1</sup>.

1. Se puede observar que la concentración al 2% generó estabilidad en el cultivo de *S.quadricauda*. La hora cero se empezó a partir de las 9 am hasta completar las 24 horas.

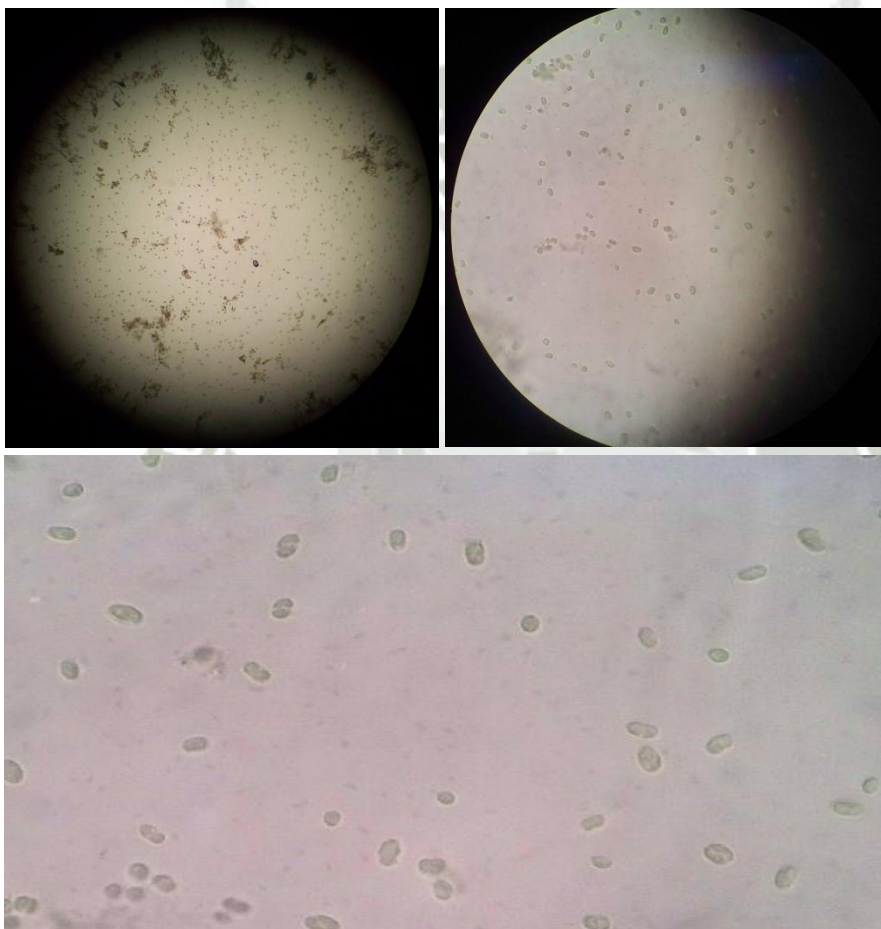
La agitación generada por el burbujeo de CO<sub>2</sub> al sistema, evitó fenómenos de creación de distintas zonas de cultivo con diferente temperatura. Para la presente tesis, el método para crear agitación forzada, se estableció mediante el uso de una bomba de aire de 3,5 W de potencia y con una velocidad de salida de 10 cm/seg, suficiente para recircular el cultivo por el interior del FBR.

#### 4.4 CONDICIONES DEL DESARROLLO DE *S.quadricauda* EN EL FBR

La población microalgal se cuantificó inicialmente en un promedio de  $4,5 \cdot 10^6$  células/mL por cada fotobioreactor como inóculo inicial. En los muestreos realizados para su

seguimiento, se observaron formaciones compuestas por colonias de dos células alargadas, que se identificaron claramente como autosporas.

Las condiciones de cultivo inicial para las microalgas fueron con un inóculo de  $4,5 \cdot 10^6$  células/mL, con temperatura variable, una intensidad luminosa con sombra al 35%, esto debido a que en la prueba de acondicionamiento, se experimentó con una intensidad luminosa máxima es decir al aire libre sin sombra alguna, lo que ocasionó fotoinhibición de las algas debido a exceso de luz en el sistema FBR.

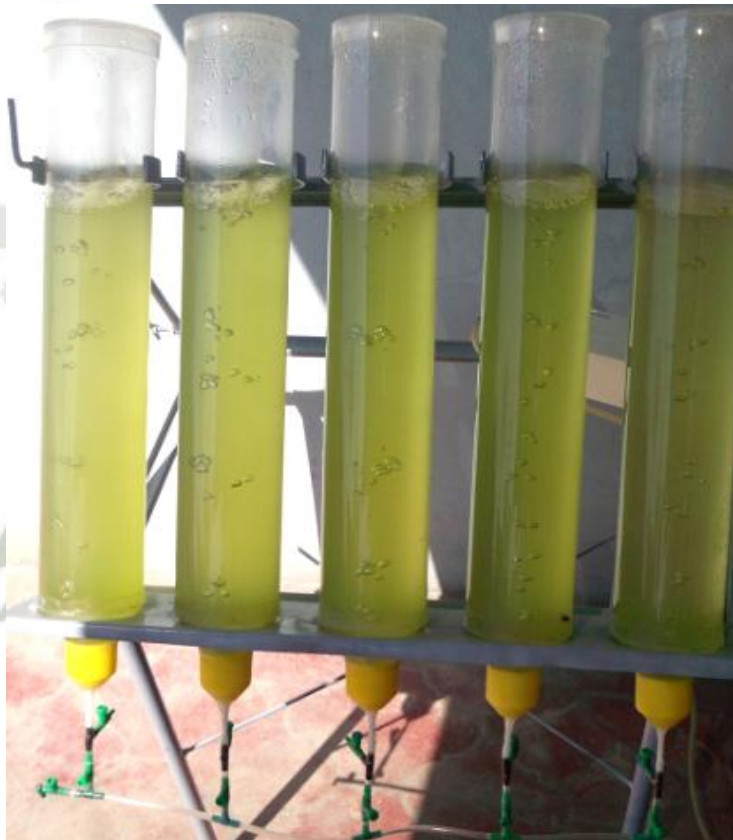


**Fig N°28.** Fotografías del resultado de la observación al microscopio a 10X y 40X del desarrollo microalgal de la cepa *S. quadricauda*

De igual manera con respecto al ingreso de CO<sub>2</sub>, se decidió trabajar con una concentración final al 2% de flujo de velocidad de salida porque en la prueba de acondicionamiento, al

alimentar al FBR con concentraciones de 100 % y 50%, se produjo la floculación y posterior muerte y precipitación de las microalgas debido al exceso de CO<sub>2</sub> en el sistema.

En cuanto a las condiciones experimentales del desarrollo de las microalgas en el sistema, se evaluaron 2 tratamientos: un control (sin flujo de CO<sub>2</sub>) y un tratamiento con CO<sub>2</sub>; los ensayos con los tratamientos fueron realizados por triplicado teniendo una duración de 9 días cada uno.



**Fig N°29.** Condiciones iniciales del cultivo *Scenedesmus quadricauda* en el FBR

Se contó con un inóculo inicial de  $4,5 \cdot 10^6$  células/mL para el primer día de funcionamiento. La temperatura promedio fue de 23 °C, el pH se mantuvo estable con una velocidad de ingreso de CO<sub>2</sub> al 2%.

Los periodos de luz/oscuridad para el FBR fueron de 7 horas y procedieron de fuentes de energía de luz natural cuya principal ventaja con respecto a la fuente artificial es el ahorro energético, teniendo como desventaja el hecho de que no puede ser controlada de forma natural pero sí de forma artificial, cubriendo al sistema con mallas para proporcionarle sombra.



**Fig N°30.** Crecimiento y desarrollo de *S. quadricauda*

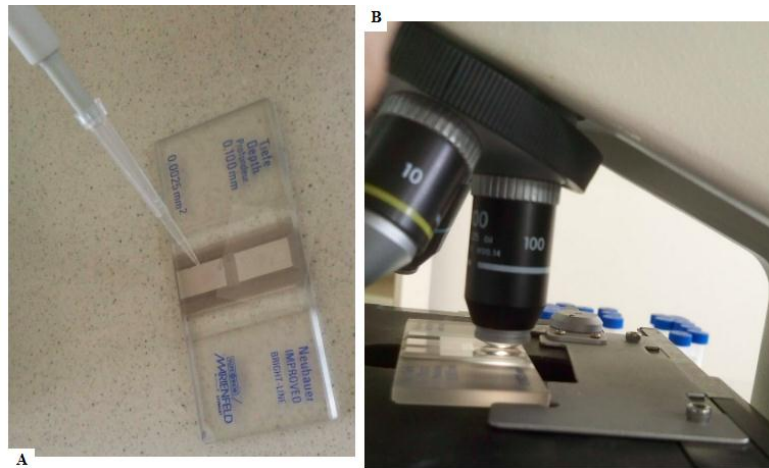
En la figura se puede apreciar el cultivo en pleno crecimiento en el cuarto día de experimentación con CO<sub>2</sub> (representado a partir del segundo tubo de la izquierda) y el control representado por el primer tubo de la izquierda.



**Fig N°31.** Condiciones finales y resultado del crecimiento de *S. quadricauda*<sup>1</sup>

1.El periodo final de la experimentación fue de 9 días; puede observarse claramente las diferencias de ambos tratamientos (el tubo control pertenece al primer tubo de la izquierda).

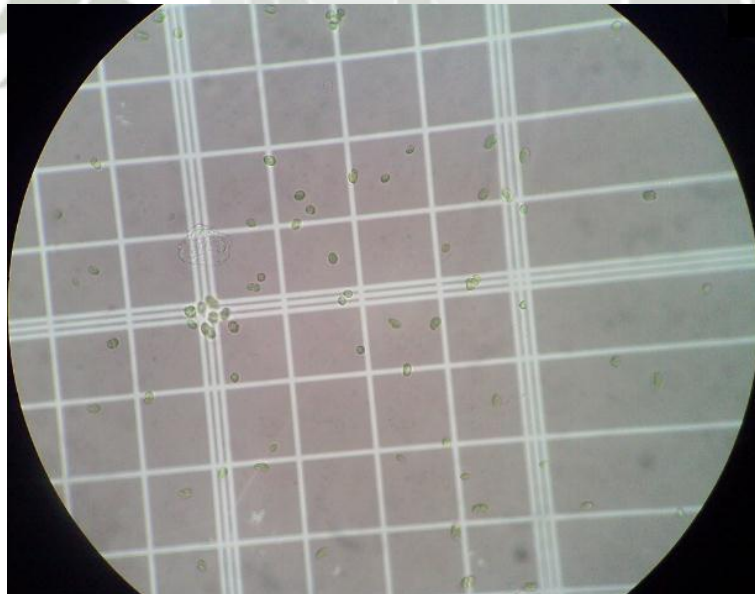
Para determinar el crecimiento microalgal se realizaron conteos celulares mediante el uso de la cámara de Neubauer, se extrajeron muestras cada 12 horas y se fue midiendo la concentración celular. En las figuras 32 y 33 se puede apreciar el conteo de células de los tubos fotobiorreactores en el cuarto día de funcionamiento.



**Fig N°32.** Preparación y observación al microscopio.

A. Carga con 10  $\mu$ L de muestra de la microalga en cámara Neubauer

B. Observación en microscopio con objetivo de 100X



**Fig N°33.** Conteo de *S. quadricauda* en cámara de Neubauer<sup>1</sup>.

1. Imagen tomada a 40X; en el conteo celular realizados para el seguimiento y registro de la microalga, se observaron formaciones compuestas por colonias de dos células alargadas, que se identificaron claramente como autosporas.

A continuación se detallan los parámetros seguidos para el proceso de operación final del sistema FBR:

**Tabla N°9.** Parámetros de operación en el FBR

<b>PARÁMETROS DE OPERACIÓN</b>	<b>RANGO</b>	<b>UNIDADES</b>
Diámetro de cada tubo FBR	9,5	cm
Altura	57	cm
Volumen de operación	0,035-0,040	m <sup>3</sup>
Intensidad de luz <sup>1</sup>	sombra al 35 % 51200	Porcentaje Lux
Velocidad de Flujo CO <sub>2</sub>	2	Porcentaje
Temperatura <sup>2</sup>	23	°C
pH	7-8	Medida de pH

1. La intensidad de luz se midió de acuerdo al porcentaje de sombra proporcionada por una malla tipo Raschel en Lux.

2. El registro de la temperatura se obtuvo de acuerdo al promedio de las temperaturas de los 9 días del periodo de experimentación.

Los parámetros pre-iniciales de operación (flujo de CO<sub>2</sub>, temperatura y pH), sirvieron de base para configurar los parámetros adecuados para la fase experimental definitiva y se tomaron aquellos valores que dieron resultados de desempeño del FBR óptimos en el desarrollo de biomasa microalgal. Las condiciones de operación del FBR se eligieron a partir de prueba de acondicionamiento con el fin de adecuar el manejo del cultivo de la microalga en función de los requerimientos de biomasa y tiempo de abastecimiento del cultivo, es decir, permitieron incrementar la producción de microalgas en condiciones de laboratorio y así evitar posteriores problemas en la parte experimental.

#### 4.5 CONSUMO DE CO<sub>2</sub>

##### EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CO<sub>2</sub> EN EL FBR

Debido a que en la presente tesis fue difícil usar la fuente de CO<sub>2</sub> a partir de chimeneas propiamente procedente de fábricas industriales, se simuló el proceso de alimentación sustituyéndose por un balón de CO<sub>2</sub>, el cual sirvió para los propósitos experimentales pero no se pudo aplicar para la verdadera mitigación de CO<sub>2</sub> debido a que involucraría a muchos más componentes.

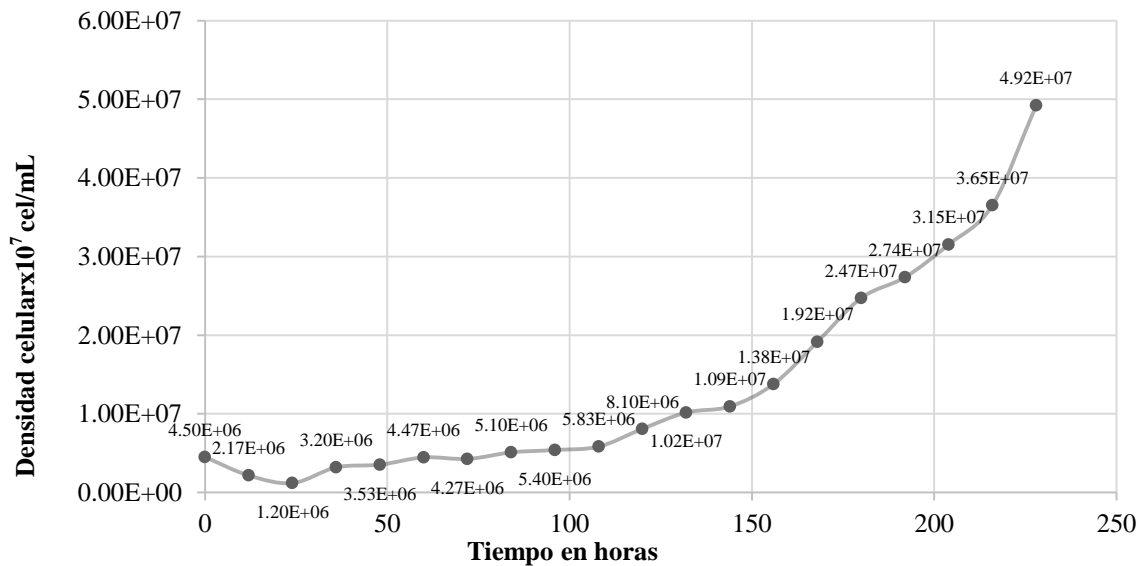
El sistema FBR con 3,5 L de medio de cultivo en cada tubo fue inoculado con 300 mL del inóculo de *S. quadricauda* y alimentados con una mezcla de CO<sub>2</sub> al 2 % e intensidad de luz continua (sombra al 35%) en el día. Durante 9 días se monitoreó la biomasa, el pH, temperatura y la concentración de CO<sub>2</sub> residual desde el inicio hasta el final del proceso de experimentación en los fotobioreactores.

En esta etapa se compararon 2 tratamientos : control y con CO<sub>2</sub>. Los cultivos dosificados con CO<sub>2</sub> en relación a los que crecieron sin este, crecieron más rápidamente debido al aporte de la fuente inorgánica de carbono el cual favorece la fijación fotosintética de dicho nutriente.

- Sistema FBR alimentado solo con CO<sub>2</sub>

Dado que el incremento del pH en el cultivo fue un indicador de la cantidad de CO<sub>2</sub> disuelto disponible para las algas, era de esperarse un mejor crecimiento microalgal. Por lo tanto se demuestra en el crecimiento de las microalgas que en la actividad fotosintética que realizan al consumir CO<sub>2</sub> hace que el medio se vaya basificándose cada vez más hasta un pH de 8,35(maximo) ,el nivel de CO<sub>2</sub> desaparece y empiezan a aparecen los carbonatos como producto de la reacción del CO<sub>2</sub> con el agua.

La mezcla de los nutrientes fue muy importante para el desarrollo de *S. quadricauda* ya que estas microalgas tienen una capacidad de asimilación de nutrientes muy rápida. Mediante el movimiento de las células, se aseguró que a todas les fuera a incidir la luz por igual, es decir, que todas las células microalgales estuvieron expuestas a la misma cantidad de luz incidente, por lo que se evitó el efecto de autoensombrecimiento.



**Fig N°34.** Curva de crecimiento de biomasa de *S. quadricauda* <sup>1</sup>

1. Células/mL vs tiempo (horas) en el FBR, con suministro del 2% de CO<sub>2</sub>, en donde cuantitativamente se puede observar y demostrar el efecto del CO<sub>2</sub> en el crecimiento de las algas.

En la figura anterior, se puede observar el crecimiento en fase exponencial observándose nítidamente el efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> respecto al incremento del crecimiento de las algas en la presencia y duración de la fase Lag. La fase de crecimiento se observó a partir del quinto día en adelante ; hasta el noveno día alcanzó un promedio de  $4,92 \cdot 10^7$  células/mL.

- Sistema FBR sin alimentación con CO<sub>2</sub> (control)

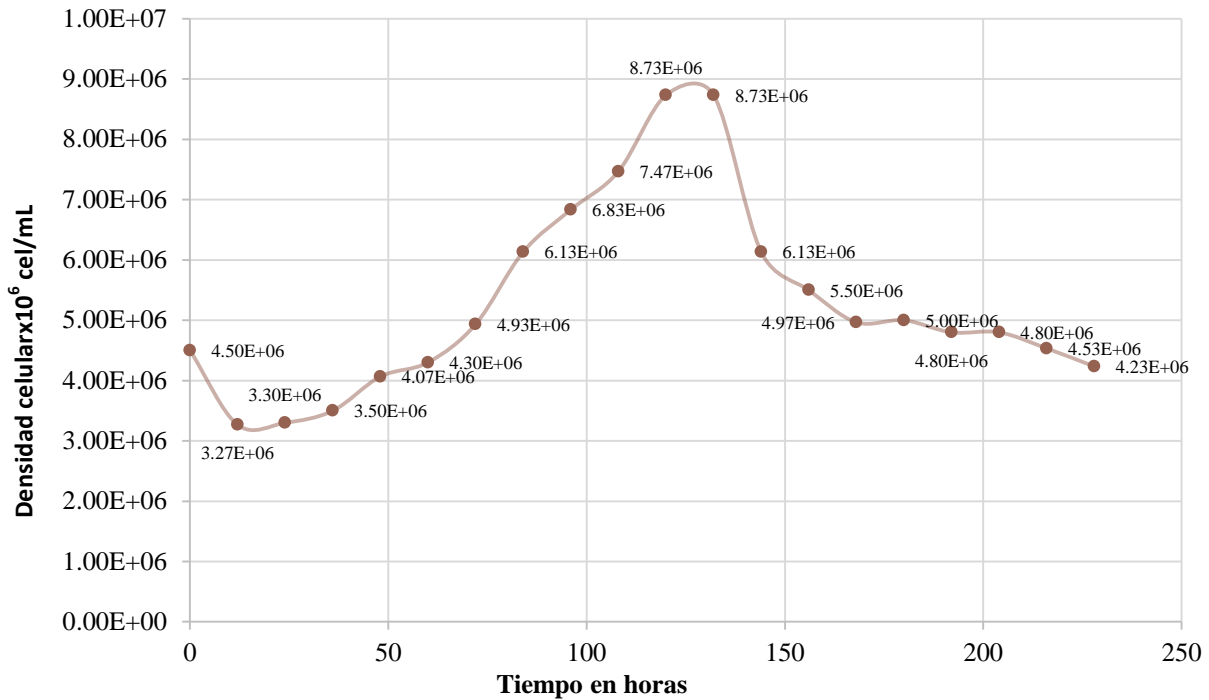
Para este tratamiento el sistema no fue alimentado con CO<sub>2</sub>, tan solo recibió agitación (O<sub>2</sub>) para homogenizar el cultivo. Por otro lado el experimento fue realizado en las mismas condiciones experimentales que el anterior tratamiento.

Su población celular se duplicó cada día a partir del tercer día observándose un incremento exponencial hasta el quinto día, en donde alcanzó la fase estacionaria .A partir del cuarto día se observaron colonias de 2 a 4 células, lo cual indica que empezaba la fase de reproducción.

A fin de evitar una larga fase Lag se utilizaron inóculos de cultivos creciendo exponencialmente y en adecuada concentración microalgal.

A partir del sexto día la concentración de microalgas con un promedio de  $8,37 \cdot 10^6$  células/mL, dejó de estabilizarse y la concentración comenzó a disminuir abruptamente

hasta alcanzar rangos de  $4,53 \cdot 10^6$  hasta  $4,23 \cdot 10^6$  células/mL en el noveno día de cultivo, esto debido a que el poco  $\text{CO}_2$  como fuente carbonada contenido en el medio ambiente no era suficiente para el requerimiento energético de las microalgas y por lo tanto la escases de  $\text{CO}_2$  hizo que las algas dejen de reproducirse y mueran.



**Fig N°35.** Curva de crecimiento de *S. quadricauda* control.

En la figura, se puede apreciar que la concentración inicial de  $4,5 \cdot 10^6$  células/mL a tiempo cero, comenzó a decrecer hasta  $3,27 \cdot 10^6$  células/mL, esto fue debido a la fase de adaptabilidad de la microalga a su nuevo entorno.

Se puede observar luego, que el cultivo presentó valores elevados con respecto al inicio a partir del tercer día, esto como consecuencia de la actividad fotosintética de las microalgas, alta producción de  $\text{O}_2$  y del consumo natural del  $\text{CO}_2$ . Ya para el noveno día se observó una decreciente concentración llegando a los  $4,23 \cdot 10^6$  células/mL.

Finalmente es importante mencionar que el rápido crecimiento exponencial alcanzado, se debió a la adecuada cantidad de inóculo empleado al inicio ( $4,5 \cdot 10^6$  células /mL).

## DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE CO<sub>2</sub> EN EL FBR

Para esta fase experimental se procedió a cuantificar por el método de titulación por valoración el CO<sub>2</sub> residual que estuvieron presentes en las muestras previamente extraídas para un periodo de 9 días en total para ambos tratamientos (con y sin CO<sub>2</sub>). Se utilizó como solución titulante al NaOH 0,01M y la fenolftaleína como indicador del punto final.

La reacción de CO<sub>2</sub> con NaOH es:



La fenolftaleína es un indicador que presenta color rosa en soluciones básicas, cuando hay presencia de CO<sub>2</sub> en la solución, esta no presenta color, sin embargo al agregarle un cierto volumen de NaOH cuya concentración es conocida se puede determinar fácilmente la concentración del CO<sub>2</sub> presente en la muestra.

Para el cálculo de la concentración de CO<sub>2</sub>, se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_m = \frac{n}{V}$$

Despejando n tenemos:  $n = C_m V$  (8)

Donde

n: Moles de CO<sub>2</sub>

V: Volumen agregado de NaOH

C<sub>m</sub>: Concentración molar de NaOH

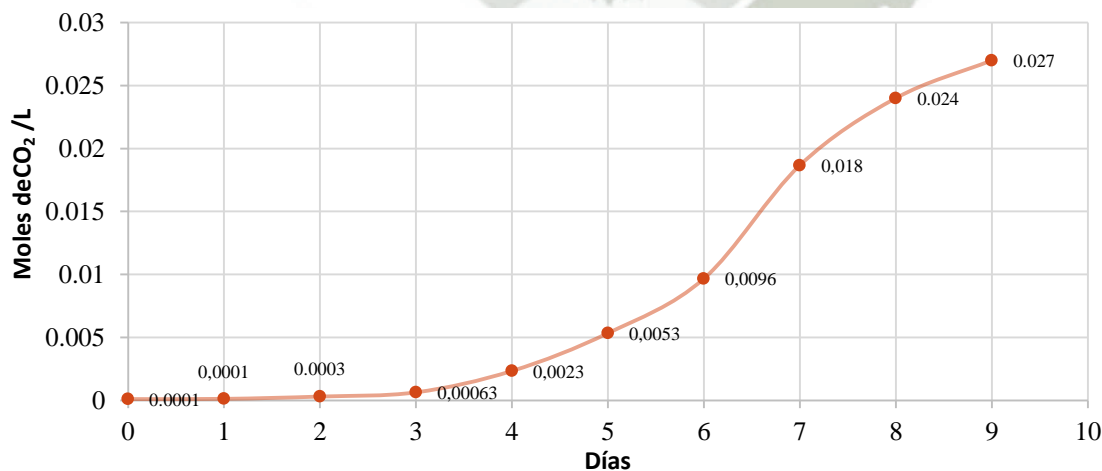
Como la relación es 1:1, los moles agregados de NaOH son iguales a los moles presentes de CO<sub>2</sub>.



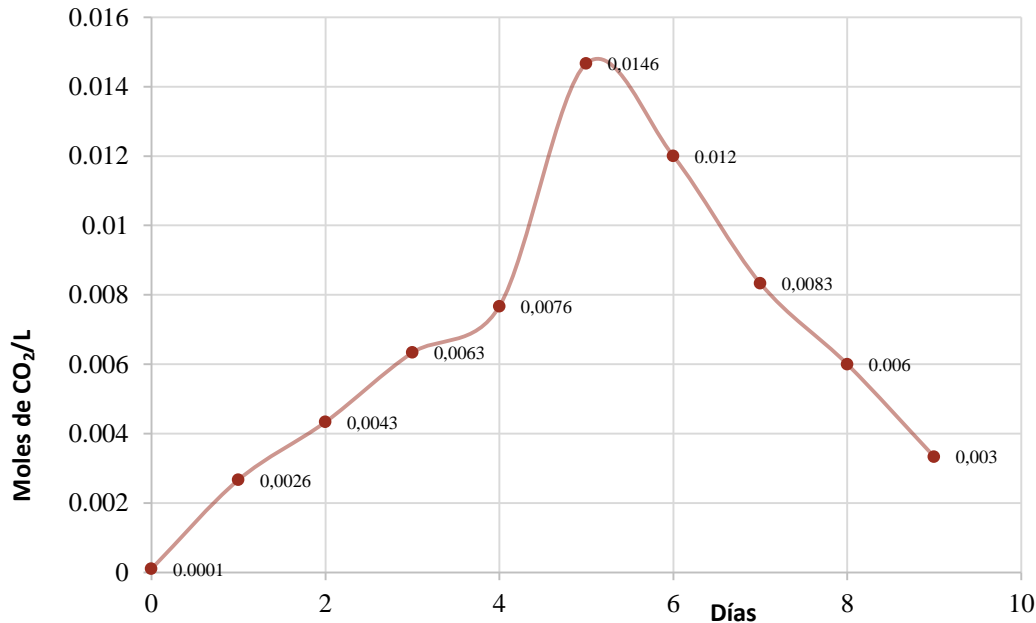
**Fig N°36.** Titulación de la muestra con NaOH.

Cada muestra de 10 ml se tituló con NaOH; la fenolftaleína indicó el punto final de cada prueba y se midió finalmente el gasto de NaOH para su cuantificación respectiva para ambos tratamientos.

La capacidad máxima de consumo de  $\text{CO}_2$  al 2% de concentración observada fue de 0,027 moles  $\text{CO}_2/\text{L}$  para el tratamiento con  $\text{CO}_2$ . Como se puede apreciar en la figura 37, la capacidad de captura se mantuvo creciente a partir del cuarto día hasta el fin del experimento a los nueve días.

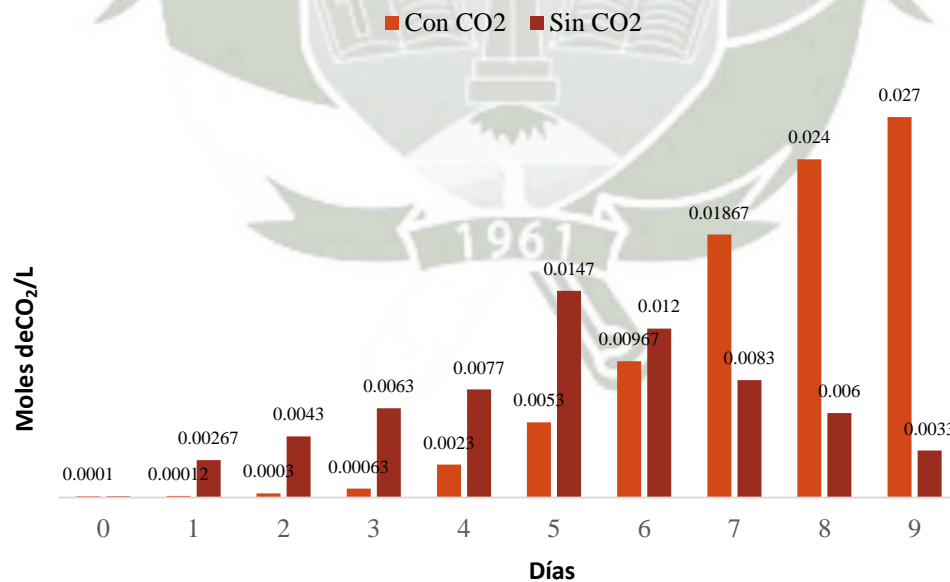


**Fig N°37.** Resultado del consumo de  $\text{CO}_2$  de *S.quadricauda* para el tratamiento con  $\text{CO}_2$  expresado en moles  $\text{CO}_2/\text{L}$ .



**Fig N°38.** Resultado del consumo de CO<sub>2</sub> de *S. quadricauda* para el tratamiento control expresado en moles CO<sub>2</sub>/L.

En la figura se muestra la curva de crecimiento y capacidad de captura de CO<sub>2</sub> al 2% de concentración de CO<sub>2</sub>, el mayor consumo se logró a los 5 días con una concentración máxima de 0,014 moles CO<sub>2</sub>/L descendiendo finalmente hasta los 0,003 moles CO<sub>2</sub>/L.



**Fig N°39.** Cuadro comparativo de la eficiencia en la determinación del consumo de CO<sub>2</sub> de *S. quadricauda* expresados en moles CO<sub>2</sub>/L.

Los resultados de la figura 39, muestra clara eficiencia para el consumo de CO<sub>2</sub> en lo que respecta al crecimiento a partir de una misma concentración microalgal inicial. El crecimiento control (sin CO<sub>2</sub>) alcanzó un pico máximo de 0,014 moles de CO<sub>2</sub>/L a los 5 días de cultivo, a partir del cual por falta de concentración de CO<sub>2</sub> como fuente carbonada alcanzó un descenso de 0,003 moles de CO<sub>2</sub>/L al finalizar la prueba experimental.

#### 4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la tabla 10 ,según la prueba de t-Student para muestras independientes se observa que el crecimiento de *S. quadricauda* a las 12,24,48,108,132,144,156,168,180,192,204,216 y 228 horas en el fotobioreactor con el tratamiento con y sin CO<sub>2</sub> presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto a la curva de crecimiento de la microalga.

**Tabla N°10.** Comparación de la biomasa de la microalga en el fotobioreactor con y sin suministro de CO<sub>2</sub>

Tiempo	Con CO <sub>2</sub>	Control	t-Student	Significancia (Valor P)
	Promedio de biomasa(células/ml)			
0	—	—	—	—
12	326670±230940	2166670±288675	5,15	0,01 <sup>1</sup>
24	12000±300000	3300000±360555	7,75	0,00 <sup>1</sup>
36	32000±264575	3500000±200000	1,57	0,19
48	3533330±208167	4066670±230940	2,97	0,04 <sup>1</sup>
60	4466670±602771	4300000±43589	-0,39	0,72
72	4266670±351188	4933330±251661	2,67	0,06
84	5100000±360555	6133330±602771	2,55	0,06
96	5,4•10 <sup>6</sup> ±2.75136•10 <sup>6</sup>	6833330±351188	0,9	0,42
108	5833330±305505	7466670±416333	5,48	0,01 <sup>1</sup>
120	8100000±3.47707•10 <sup>6</sup>	8733330±208167	0,31	0,77
132	101667±472582	8733330±57735	-5,21	0,01 <sup>1</sup>
144	109333±763763	6133330±321455	-10,03	0,00 <sup>1</sup>
156	138000±1.37477•10 <sup>6</sup>	5500000±360555	-10,11	0,00 <sup>1</sup>
168	191667±1.76163•10 <sup>6</sup>	4966670±25166	-13,82	0,00 <sup>1</sup>
180	247333±1.11505•10 <sup>6</sup>	5000000±26457	-29,82	0,00 <sup>1</sup>
192	273667±70946	4800000±43589	-46,94	0,00 <sup>1</sup>
204	315333±1.35031•10 <sup>6</sup>	4800000±30000	-33,47	0,00 <sup>1</sup>
216	36533300±802081.	4533330±251661.	-65,93	0,00 <sup>1</sup>
228	49233300±1.55349•10 <sup>6</sup>	4233330±230940.	-49,63	0,00 <sup>1</sup>

1. Diferencias estadísticas al 5% de significancia.

En la tabla anterior, según la prueba de T de estudio para muestras independientes se observa que la concentración residual de CO<sub>2</sub> en el fotobioreactor desde el primer día hasta el noveno día presentó diferencias estadísticas significativas. Los valores de biomasa corresponden al promedio de los resultados expresados en células/ml.

**Tabla N°11.** Comparación del consumo de CO<sub>2</sub> en el fotobioreactor con y sin suministro de CO<sub>2</sub>

Tiempo	Con CO <sub>2</sub>	Control	t-Student	Significancia (Valor P)
	Promedio del consumo de CO <sub>2</sub> (moles CO <sub>2</sub> /L)			
0	0,01	0,01	—	—
1	0,01±0,007	0,266±0,11547	3,82	0,0188 <sup>1</sup>
2	0,03±0,017	0,433±0,11547	5,98	0,0039 <sup>1</sup>
3	0,06±0,0321	0,633±0,11547	8,24	0,00 <sup>1</sup>
4	0,23±0,0577	0,766±0,057735	11,31	0,00 <sup>1</sup>
5	0,53±0,0577	1,46±0,208167	7,48	0,00 <sup>1</sup>
6	0,96±0,208	1,2±0,173205	1,49	0,21 <sup>1</sup>
7	1,86±0,058	0,833±0,057735	-21,92	0,00 <sup>1</sup>
8	2,4±0,173	0,6±0,173205	-12,73	0,00 <sup>1</sup>
9	2,7±0,435	0,333±0,11547	-9,09	0,00 <sup>1</sup>

1. Diferencias estadísticas al 5% de significancia

Según la prueba de T de estudio para muestras independientes se observa que la concentración residual de CO<sub>2</sub> en el sistema FBR desde el primer día hasta el noveno día presentó diferencias estadísticas significativas. Los valores del consumo de CO<sub>2</sub> corresponden al promedio de los resultados expresados en moles CO<sub>2</sub>/L. Interpretando que los resultados son muy probables que sean ciertos y no que sean producto del azar.

## CONCLUSIONES

- El diseño del FBR responde al de tipo Batch, régimen discontinuo de funcionamiento y cerrado, lo cual permitió el seguimiento del proceso de evaluación del rendimiento de la microalga *Scenedesmus quadricauda*. Para su construcción, se establecieron finalmente las siguientes dimensiones: longitud total 59,5 cm; diámetro de los tubos 9,5 cm; volumen efectivo 0,035 m<sup>3</sup>; volumen total 0,040 m<sup>3</sup>; se elaboraron los tubos en forma cilíndrica con un terminal cónico y un sistema de soporte.
- En cuanto al acondicionamiento del FBR, se operó con una velocidad de flujo parcial de CO<sub>2</sub> al 2% ,50 y al 100% siendo la concentración óptima al 2%; pH controlado y temperatura promedio de 22,8°C. En cuanto a los tratamientos con y sin CO<sub>2</sub>, se obtuvo como resultado comparativo una mejora en el tratamiento con suministro de CO<sub>2</sub>, llegando a una concentración máxima de 4,9200•10<sup>7</sup> células/mL en comparación al tratamiento control, con un pico máximo de 8,7300•10<sup>6</sup> células/mL. Las variaciones en la temperatura estuvieron en función de la intensidad de la radiación solar sobre el sistema.
- En cuanto a la irradiación solar, se experimentaron 2 sistemas; donde se obtuvo un mejor resultado a una intensidad luminosa de 51200 Lux con efecto de sombra al 35% en comparación al tratamiento sin sombra alguna.
- En la parte de evaluación de las microalgas, se determinó el consumo de CO<sub>2</sub> comparando ambos tratamientos, haciendo uso de los indicadores: pH (mínimo 4,98 y máximo 8,34), temperatura (rangos desde 16,2°C hasta 23,3 °C) y velocidad de flujo CO<sub>2</sub> (2% de CO<sub>2</sub>), obteniendo resultados favorables alcanzando una concentración de 0,027 moles de CO<sub>2</sub>/L (valor tomado a los 9 días del desarrollo del experimento); cabe resaltar que ese valor estuvo con tendencia a seguir incrementándose si el periodo experimental se hubiese prolongado.

## SUGERENCIAS

- Es necesario incrementar el número de experiencias con las diferentes variedades de microalgas que existen no solo a nivel local sino también a nivel internacional e investigar sus propiedades tanto como potenciales agentes no solo de descontaminación sino también como biotransformadoras, biocontroladoras y/o mitigadoras de los diferentes GEI que día a día van incrementándose y así de esta manera contribuir a disminuir el efecto invernadero y a restablecer el equilibrio térmico del planeta.
- Sería importante evaluar también la influencia de diferentes intensidades luminosas en el relación al consumo de CO<sub>2</sub>; otro aspecto importante es el efecto de la intensidad de luz en relación al ángulo de inclinación de los tubos y la distancia entre tubos para el desarrollo de la microalga.
- A pequeña escala, el presente estudio podría ponerse a prueba en fuentes pequeñas de emisiones de CO<sub>2</sub> como son las pollerías de la ciudad; y la producción a gran escala, se podría emplear en sectores como acuicultura, cosmética, nutrición y sobre todo energía, utilizándola como biocombustible a partir de éster metílico generado a partir de la extracción su aceite vegetal.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alegre de la Cruz R. 2008. Escenarios Climáticos Locales en Arequipa 2010– 2030. Informe Consultoría. Medida Piloto de Adaptación al Cambio Climático. GTZ.
2. AlgaeBase. Disponible en [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)
3. Aresta M., Dibenedetto A., Barberio G. 2005. Utilization of macro-algae for enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuels production: Development of computing software for an LCA study. *Fuel Process Technol.* 86:1679-1693.
4. Arredondo B., Vázquez-Duhalt R. 1991. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo.* 17: 99-111.
5. Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX. 2006 .Microalgal Reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 22: 1490-1506.
6. Castillo, J. Pajón, 2010. Técnicas analíticas de campo .Determinación de CO<sub>2</sub> en aguas.
7. Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26: 126-131.
8. Dawes C. 1991. Botánica marina. Ed. Limusa. México.
9. Evans GM., Furlong JC. 2003. Environmental Biotechnology: Theory and Application. John Wiley and Sons, Ltd. England.
10. Doran P. 1998. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Ed. Acribia, S.A. España.
11. García V. 2010. Captura de CO<sub>2</sub> mediante algas unicelulares. Escuela técnica superior de ingenieros agrónomos, departamento de producción vegetal: fitotecnia universidad politécnica de Madrid.

12. GTZ, 2008. Evaluación de la vulnerabilidad e impactos del cambio climático y del potencial de adaptación en América Latina. Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2008-05928 Lima – Perú, 68 paginas.
13. Graham L., Wilcox LW., 2000. Algae. Prentice Hall Inc. USA.
14. González L, Cañizares R, Baena S., 1997 .Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Biores. Technol.* 60: 259-262.
15. Gudin C, Chaumont D (1983) Solar biotechnology study and development of tubular solar receptors for controlled production of photosynthetic cellular biomass. In Palz W, Pirrwitz D (eds), Proceedings of the Workshop and E.C. Contractor's Meeting in Capri. D. Reidel Publishing Co., Dordrecht, 184-193.
16. Koch, A.L. 1981. Growth Measurement. In Manual of Methods for General Bacteriology P. Gerliardt (Ed). American Society for Microbiology. Washington D.C. U.S.A.
17. Kommareddy, A., Anderson G. 2004. Estudio de los requerimientos de luz de un Fotobioreactor, Universidad de Dakota.
18. Hu, Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621-639.
19. IPCC, 2007. Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. IPCC, Ginebra, Suiza, 104 pp.
20. J.Coulson., J.Richardson, 1981.Ingeniería Química, Tomo II .Operaciones Básicas, Ed. Reverté, Barcelona, España.

21. Johansen BE, 2008. Global warming 101. Greenwood Press. USA
22. Lee RE., 1999. Phycology. 3 Ed. Cambridge University Press. United Kingdom
23. Lewin, R. A., 1967. Physiology and Biochemistry of algae. Academic Press. New York and London. U.S.A
24. Martínez J., Fernández B. 2004. Cambio climático una visión desde México. INE-SEMARNAT. México.
25. Mathews C., Van Holde K., 2005. Bioquímica. 3ra edición. Ed. Pearson. España.
26. Moroney J., Somanchi A. 1999. How Do Algae Concentrate CO<sub>2</sub> to Increase the Efficiency of Photosynthetic Carbon Fixation. Plant. Physiol. 119:9-16
27. Moreno , 2008. Métodos de depuración de bajo costo para aguas residuales urbanas, basado en la actividad de las microalgas (*Scenedesmus* y *Chlorella*) en un fotobioreactor cerrado. Universidad de Sevilla. Tesis de Maestría.
28. OILGAE, 2009 .Capture of CO<sub>2</sub> Emissions Using Algae. A research Document by Oilgae, Chennai, 22 p.
29. Prakash A, Margaritis A, Saunders RC, Vijayan, S., 1999. High concentrations ammonia removal by the cyanobacterium *Plectonema boryanum* in a photobioreactor system. Can. J. Chem. Eng. 77: 99-106.
30. Pirt S, Lee Y, Walach M, Pirt M, Balyuzi H, Bazin M. 1983. A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. J. Chem. Tech. Biotechnol. 33: 35-58.
31. Pulz O., 2001. Photo bioreactors: Production Systems for Phototrophic Microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 287-293.
32. Pulz O., Gross W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. Appl Microbiol Biotechnol. 65:635-648.

33. Pulz O., Scheibenbogen K. 1998 .Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *In: Advances in biochemical engineering / biotechnology*. Scheper T .Edition Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp. 123-152.
34. Ramanathan V., Feng Y. 2009. Air pollution, greenhouse gases and climate change: Global and regional perspectives. *Atmos Environ*. 43:37-50.
35. Richmond A.2000. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view .*Phycol*. 12:441-451.
36. Rittmann B., 2008. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol. Bioeng*. 100: 203-212.
37. Sánchez M., García C., Contreras G., Molina G., Chisti Y. 2000. Bubble column and airlift photo bioreactors for algal culture. *Aiche J*. 46 :( 9) 1872-1887.
38. Schenk P, Thomas-Hall S., Stephens E., Marx U., Mussnug J., Posten C., Kruse O., Hankamer B., 2008 .Second Generation Biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy. Res*. 1: 20-43.
39. Skjanes K., Lindblad P., Muller J. 2007. BioCO<sub>2</sub> – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO<sub>2</sub> while producing H<sub>2</sub> and high value products. *Biomol Eng*. 24: 405-413.
40. Sheehan J, Dunahay T, Benemann J., 1998. A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program – biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO; Report NREL/TP-580-24190, 328 p.  
Disponible en: [www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf](http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf)
41. SINIA, 2012. Emisiones de Gases de Efecto Invernadero. Disponible en: <http://sinia.minam.gob.pe/index.php?idElementoInformacion=1182&idformula=119&idTipoElemento=&tipoelemento=>

42. Stein, J. R. 1973. Handbook of Psychological Methods. University Press. Cambridge, 448 pp.
43. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., 2006. Commercial applications of microalgae. J Biosci Bioeng. 101:87-96.
44. Solovchenko A, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Cohen Z, Merzlyak M., 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. J Appl Phycol 20:245–251
45. Toledo Cervantes A. 2010. Captura de CO<sub>2</sub> por una comunidad de microalgas obtenidas de un ecosistema natural mexicano .Tesis para obtener el grado de Maestra en Biotecnología, Universidad Autónoma metropolitana.
46. Torzillo G, Pushparaj B, Bocci F, Balloni W, Materassi R, Florenzano G. 1986. Production of Spirulina biomass in closed photobioreactors. Biomass 11: 61-74.
47. Unamunzaga, C., Cañavate, J., 2003. Diseño de un fotobioreactor tubular para el cultivo masivo al exterior de la microalga marina *nannochloropsis gaditana* en la bahía de Cádiz .IX Congreso Nacional de Acuicultura.
48. Vizcarra, 2010. Laboratorio de Operaciones Unitarias. Absorción de Gases Universidad Autónoma Metropolitana.
49. Vasquez, Heussier, 1985. Carbon Dioxide Balance in Open Air Mass Culture of algae. Arch. Hydrobiol. Beih, 20:95-113.
50. Wang B., Li Y., Wu N., Lan Q., 2008. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. Appl Microbiol Biotechnol. 79:707-718.

51. Wijffels RH .2008. Potential of Sponges and Mmicroalgae for Marine Biotechnology. Trends Biotechnol. 26: 26-31. Nota de prensa, INRENA, Marco Zapata. Lima, 06 de septiembre 2005.
52. Zapata, R., 2006. Los efectos de los desastres en 2004 y 2005: la necesidad de adaptación de largo plazo, serie Estudios y perspectivas, N° 54 (LC/MEX/L.733), México, D.F., sede subregional de la CEPAL en México. Publicación de las Naciones Unidas, N° de venta: S.06.II.G.123.



## ANEXOS

### ANEXO 1

#### MEDIO F/2 DE GUILLARD

La principal finalidad de cualquier medio de cultivo es soportar el rápido crecimiento durante largo tiempo sin requerir frecuentes reemplazos o dosificación de sus componentes, asimismo que la composición de sus nutrientes esté bien balanceada.

El medio de cultivo original para la microalga *Scenedesmus* usado para su producción masiva, se caracterizó por estar compuesto de los componentes propios del medio Guillard, pero debido a resultados de experimentación negativos en la prueba pre-experimental, se optó por modificar el medio de cultivo original añadiendo urea como fuente nitrogenada (1ml/L a partir de una solución stock de 8gr urea/100 ml de agua destilada).

**Tabla N°12.** Composición del medio de cultivo Guillard.

NUTRIENTES	SOLUCIÓN PRIMARIA
1. Nitrato de Sodio	75 gr/L
2. Fosfato de Sodio	5 gr/L
3. Metasilicato de Sodio	30 gr/L
4. Metales Trazas:	
Cloruro férrico	3,15 gr/L
EDTA	4,36 gr/L
Solución Sulfato cúprico (9.8 gr/L)	1 ml
Solución Sulfato de zinc (22 gr/L)	1 ml
Solución Cobalto clorado (10 gr/L)	1 ml
Solución Cloruro de manganeso (180 gr/L)	1 ml
Solución Molibdato de sodio (63 gr/L)	1 ml
5. Vitaminas	
Cianocobalamina	0,001 gr/L
Tiamina	0,02 gr/L

## ANEXO 2

### TABLAS DE DATOS PARA MEDIR EL EFECTO DE LA VARIACIÓN DEL pH Y TEMPERATURA EN EL FBR

**Tabla N°13.** Variación en días de pH y temperatura del cultivo microalgal<sup>1</sup>

Tiempo (Días)	Temp °C				pH			
	1ra	2da	3ra	$\bar{X}$	1ra	2da	3ra	$\bar{X}$
0	17,1	22,8	16,8	18,9	7,35	6,57	7,58	7,17
1	16,9	21,9	17,5	18,77	7,87	5,56	8	7,14
2	17,8	22,8	16,9	19,17	8,03	4,98	7,95	6,99
3	17,1	22,6	17,5	19,07	8,07	5,98	8,03	7,36
4	17,5	22,5	16,2	18,73	8,15	6,02	8,05	7,41
5	16,6	23,2	17,6	19,13	8,11	8,3	8,12	8,18
6	17,7	22,9	17,3	19,3	8,17	6,57	8,14	7,63
7	16,9	21,7	17,4	18,67	8,21	6,41	8,06	7,56
8	17,5	22,6	17,5	19,2	8,14	6,34	7,86	7,45
9	16,8	23,3	16,5	18,87	8,04	6,38	8,03	7,48
<b>Prom</b>	17,19	22,63	17,12		8,01	6,31	7,98	
<b><math>\sigma</math></b>	0,4095	0,5078	0,4894		0,2521	0,8586	0,1623	

1. Este rango de datos corresponden al periodo experimental de 9 días en total tomadas en la semana del trece de Agosto de presente año. La desviación estándar mide cuanto se separan los datos

ANEXO 3

Tabla N°14. Variación diaria de pH y temperatura del cultivo *S.quadricauda*

Tiempo (Horas)	Temp °C			pH		
	M1	M2	$\bar{X}$	M1	M2	$\bar{X}$
0	16,6	16,8	16,7	8,11	8,04	8,08
2	16,7	17,2	16,95	8,14	8,08	8,11
4	17,7	17,7	17,7	8,24	8,12	8,18
6	18,3	18,3	18,3	8,35	8,35	8,35
8	19,1	19,1	19,1	8,27	8,38	8,325
10	23,2	23,3	23,25	8,3	8,24	8,27
12	26,2	26,2	26,2	6,04	6,38	6,21
14	25,4	25,4	25,4	6,01	6,57	6,29
16	23,6	23,6	23,6	6,34	7,32	6,83
18	21,9	21,9	21,9	7,23	7,65	7,44
20	19,2	19,2	19,2	7,65	8,14	7,90
22	17,6	16,5	17,05	8,12	7,98	8,05
<b>Prom</b>	20,46	20,43		7,57	7,77	
<b><math>\sigma</math></b>	<b>3,4342</b>	<b>3,4741</b>		<b>0,9248</b>	<b>0,6736</b>	

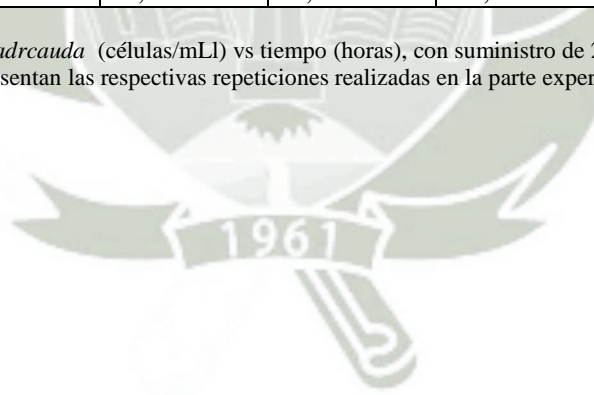
Tabla N° 15. Comparación entre promedio de la densidad para ambos tratamientos de *Scenedesmus*

Tiempo (Días)	Temp °C	Densidad microalgal	
		$\bar{X}$ Control	$\bar{X}$ con CO <sub>2</sub>
0	18,9	4,50E+06	4,50E+06
1	18,77	3,69E+06	2,62E+06
2	19,17	3,78E+06	3,37E+06
3	19,07	4,62E+06	4,37E+06
4	18,73	6,48E+06	5,25E+06
5	19,13	8,10E+06	6,97E+06
6	19,3	7,43E+06	1,06E+07
7	18,67	5,23E+06	1,65E+07
8	19,2	4,90E+06	2,61E+07
9	18,87	4,52E+06	3,91E+07

**Tabla N° 16.** Valores para la curva de crecimiento

Tiempo (Días)	Tiempo (Horas)	Células/ml			Promedio horas	Promedio días
		R1	R2	R3		
1	0	4,50E+06	4,50E+06	4,50E+06	4,50E+06	2,62E+06
	12	2,50E+06	2,00E+06	2,00E+06	2,17E+06	
	24	1,20E+06	1,50E+06	9,00E+05	1,20E+06	
2	36	3,10E+06	3,50E+06	3,00E+06	3,20E+06	3,37E+06
	48	3,60E+06	3,70E+06	3,30E+06	3,53E+06	
3	60	3,90E+06	5,10E+06	4,40E+06	4,47E+06	4,37E+06
	72	3,90E+06	4,30E+06	4,60E+06	4,27E+06	
4	84	5,20E+06	4,70E+06	5,40E+06	5,10E+06	5,25E+06
	96	8,10E+06	2,60E+06	5,50E+06	5,40E+06	
5	108	5,90E+06	6,10E+06	5,50E+06	5,83E+06	6,97E+06
	120	9,80E+06	4,10E+06	1,04E+07	8,10E+06	
6	132	9,80E+06	1,00E+07	1,07E+07	1,02E+07	1,06E+07
	144	1,01E+07	1,16E+07	1,11E+07	1,09E+07	
7	156	1,26E+07	1,35E+07	1,53E+07	1,38E+07	1,65E+07
	168	2,12E+07	1,81E+07	1,82E+07	1,92E+07	
8	180	2,60E+07	2,39E+07	2,43E+07	2,47E+07	2,61E+07
	192	2,66E+07	2,80E+07	2,75E+07	2,74E+07	
9	204	3,15E+07	3,29E+07	3,02E+07	3,15E+07	3,91E+07
	216	3,57E+07	3,73E+07	3,66E+07	3,65E+07	
	228	5,05E+07	4,97E+07	4,75E+07	4,92E+07	

1. Curva de crecimiento de *S. quadricauda* (células/mL) vs tiempo (horas), con suministro de 2 % de CO<sub>2</sub>. En el sistema, R1, R2 y R3 representan las respectivas repeticiones realizadas en la parte experimental.



**Tabla 17.** Curva de crecimiento en el sistema FBR sin alimentación con CO<sub>2</sub><sup>1</sup>.

Tiempo (Días)	Tiempo (Horas)	Células/ml			Promedio horas	Promedio días
		R1	R2	R3		
1	0	4,50E+06	4,50E+06	4,50E+06	4,50E+06	3,69E+06
	12	3,40E+06	3,40E+06	3,00E+06	3,27E+06	
	24	3,40E+06	3,60E+06	2,90E+06	3,30E+06	
2	36	3,70E+06	3,50E+06	3,30E+06	3,50E+06	3,78E+06
	48	3,80E+06	4,20E+06	4,20E+06	4,07E+06	
3	60	4,80E+06	4,10E+06	4,00E+06	4,30E+06	4,62E+06
	72	5,20E+06	4,70E+06	4,90E+06	4,93E+06	
4	84	6,20E+06	5,50E+06	6,70E+06	6,13E+06	6,48E+06
	96	6,80E+06	7,20E+06	6,50E+06	6,83E+06	
5	108	7,60E+06	7,80E+06	7,00E+06	7,47E+06	8,10E+06
	120	8,90E+06	8,80E+06	8,50E+06	8,73E+06	
6	132	8,70E+06	8,70E+06	8,80E+06	8,73E+06	7,43E+06
	144	6,50E+06	6,00E+06	5,90E+06	6,13E+06	
7	156	5,80E+06	5,60E+06	5,10E+06	5,50E+06	5,23E+06
	168	5,20E+06	5,00E+06	4,70E+06	4,97E+06	
8	180	5,10E+06	4,70E+06	5,20E+06	5,00E+06	4,90E+06
	192	5,10E+06	5,00E+06	4,30E+06	4,80E+06	
9	204	4,50E+06	5,10E+06	4,80E+06	4,80E+06	4,52E+06
	216	4,80E+06	4,30E+06	4,50E+06	4,53E+06	
	228	4,50E+06	4,10E+06	4,10E+06	4,23E+06	

1. R1, R2 y R3 representan las respectivas repeticiones realizadas en la parte experimental.

**Tabla N°18.** Determinación de la captura de CO<sub>2</sub> con CO<sub>2</sub> en el sistema FBR.

Días	Gasto NaOH 0.01M (ml)			$\bar{X}$	Moles CO <sub>2</sub> /L
	R1	R2	R3		
	0	0,01	0,01		
1	0,02	0,01	0,005	0,01166667	0,00011667
2	0,05	0,02	0,02	0,03	0,0003
3	0,1	0,05	0,04	0,06333333	0,00063333
4	0,3	0,2	0,2	0,23333333	0,00233333
5	0,6	0,5	0,5	0,53333333	0,00533333
6	1,2	0,9	0,8	0,96666667	0,00966667
7	1,9	1,8	1,9	1,86666667	0,01866667
8	2,6	2,3	2,3	2,4	0,024
9	3,2	2,4	2,5	2,7	0,027

**Tabla N°19.** Determinación de la captura de CO<sub>2</sub> de *S.quadricauda* sin CO<sub>2</sub> en el sistema FBR.

Días	Gasto NaOH 0.01M (ml)			$\bar{X}$	Moles CO <sub>2</sub> /L
	R1	R2	R3		
0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,0001
1	0,4	0,2	0,2	0,26666667	0,00266667
2	0,5	0,3	0,5	0,43333333	0,00433333
3	0,5	0,7	0,7	0,63333333	0,00633333
4	0,8	0,7	0,8	0,76666667	0,00766667
5	1,7	1,3	1,4	1,46666667	0,01466667
6	1,1	1,1	1,4	1,2	0,012
7	0,9	0,8	0,8	0,83333333	0,00833333
8	0,5	0,5	0,8	0,6	0,006
9	0,4	0,2	0,4	0,33333333	0,00333333

