

**SELECCIÓN DE MATERIALES COINMOVILIZANTES PARA LA PRODUCCIÓN  
DE BIOMASA A ESCALA DE LABORATORIO**

**MARÍA ALEJANDRA ROMERO ARIAS  
JOAO ALEXANDER GARCIA LAZARO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOMECÁNICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2010**

**SELECCIÓN DE MATERIALES COINMOVILIZANTES PARA LA PRODUCCIÓN  
DE BIOMASA A ESCALA DE LABORATORIO**

**MARÍA ALEJANDRA ROMERO ARIAS  
JOAO ALEXANDER GARCIA LAZARO**

**Trabajo presentado como requisito para optar al título de  
Ingeniero Químico**

**Director:**

**Viatcheslav Kafarov  
Ingeniero químico Dr. Sc.**

**Codirector:**

**Andrés Fernando Barajas Solano  
Biólogo.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOMECAÑICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

*A Dios, por darme la sabiduría y la fuerza para conseguir este sueño.  
A mis hermanos y familia, por su apoyo y confianza en esta etapa de la universidad  
A la U9S, por si mi casa durante estos años  
A mis amigos y a todas las personas, que de una u otra manera hicieron parte de mi  
formación  
Personal y profesional.  
Maria Alejandra Romero Arias*

*A Dios, por darme la sabiduría y la fuerza para conseguir este sueño.  
Porque No puede el hombre recibir nada, si no le fuere dado del cielo.  
A mis padres, por su apoyo y confianza.  
A la U9S, Y a todas las personas, que de una u otra manera hicieron parte de mi formación  
Personal y profesional.  
Joao Alexander García Lázaro*

## CONTENIDO

INTRODUCCION .....	15
1. MARCO TEÓRICO .....	17
1.1. Microalgas .....	17
1.2 Coinmovilización de microalgas.....	18
1.3 Concepto de coinmovilización .....	18
1.4 Tipos de coinmovilización .....	19
1.4.1 Activos.....	20
1.4.2 Pasivos.....	20
1.4.2.1 Matrices naturales u orgánicas.....	20
1.4.2.2 Matrices sintéticas o inorgánicas.....	21
1.4.2.3 Matrices poliméricos orgánicos e inorgánicos.....	22
2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	24
2.1. Objetivo del experimento. ....	24
2.2. Materiales .....	24
2.2.1 Inoculo.....	24
2.2.2. Biorreactor .....	24
2.2.3. Cultivo de microalga .....	24
2.3 Caracterización .....	25
2.3.1 Calculo de Peso Seco .....	25
2.3.2 Medición de la Absorbancia.....	25
2.4. Descripción de la etapa 1.....	26
2.5. Descripción de la etapa 2.....	26
2.6. Descripción de la etapa 3.....	27
2.7. Descripción de la etapa 4.....	27
2.8 Diagrama de bloques de la metodologia experimental .....	28
3. RESULTADOS Y ANALISIS .....	29
3.1 Resultados y análisis de la Etapa 1.....	29

3.2 Resultados y análisis de la Etapa 2.....	30
3.3 Resultados y análisis de la Etapa 3.....	34
3.4 Resultados y análisis de la etapa 4 .....	35
3.4.1 Polímero A: Poliuretano rígido .....	35
3.4.2 Polímero B: Polietileno de baja densidad.....	38
CONCLUSIONES .....	42
RECOMENDACIONES .....	43
BIBLIOGRAFIA.....	44
ANEXOS.....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Tamaño del material .....	27
<b>Figura 2</b> Diagrama de bloques de la metodología experimental .....	28
<b>Figura 3</b> Cálculo del coeficiente de extinción molar .....	29
<b>Figura 4</b> Cálculo de la velocidad específica de crecimiento.....	30
<b>Figura 5</b> Concentración en el medio para los reactores de 5 días de los dos materiales durante el tiempo de corrida .....	31
<b>Figura 6</b> Cantidad de biomasa recuperada adherida al material.....	32
<b>Figura 7</b> a) inoculación del material. b) Crecimiento de microalgas en el material y posterior c) cosecha.....	33
<b>Figura 8</b> a) inoculación del material. b) Degradación del material al cabo de 15 días. ....	34
<b>Figura 9</b> a) poliuretano rígido b) espuma de poliuretano c) polietileno de baja densidad .....	34
<b>Figura 10</b> Materiales inoculados a) poliuretano rígido b) espuma de poliuretano c) polietileno de baja densidad .....	35
<b>Figura 11</b> Inoculación del poliuretano rígido .....	36
<b>Figura 12</b> Cantidad de biomasa recuperada del poliuretano.....	36
<b>Figura 13</b> a) extracción de biomasa del material b) material al finalizar la cosecha .....	37
<b>Figura 14</b> Tubos de ensayo con la biomasa seca.....	37
<b>Figura 15</b> Inoculación del polietileno de baja densidad.....	38
<b>Figura 16</b> Cantidad de biomasa recuperada del polietileno de baja densidad. ....	39
<b>Figura 17</b> Polietileno de baja densidad en el transcurso del experimento .....	40
<b>Figura 18</b> Recuperación de biomasa el polietileno de baja densidad .....	40
<b>Figura 19</b> Obtención de biomasa entre los dos polímeros. ....	41

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Modelo experimental de etapa 2 .....	26
<b>Tabla 2</b> Modelo experimental de etapa 4 .....	27
<b>Tabla 3</b> Variación de la absorbancia con la concentración del inóculo.....	29
<b>Tabla 4</b> Medida de absorbancia a los reactores que contienen la matriz de loofha durante el tiempo determinado .....	30
<b>Tabla 5</b> Medida de absorbancia a los reactores que contienen la matriz de poliestireno durante el tiempo determinado .....	31
<b>Tabla 6</b> Biomasa en gramos (g) que se obtuvo en total de cada una de las matrices en su respectivo biorreactor .....	32
<b>Tabla 7</b> Datos de la inoculación del poliuretano en 9 reactores por 7 días. ....	35
<b>Tabla 8</b> Datos de la inoculación del polietileno de baja densidad en 9 reactores por 7 días .....	38

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO A</b> COMPOSICION DEL MEDIO .....	49
<b>ANEXO B</b> MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS .....	50
<b>ANEXO C</b> GENERALIDADES ACERCA DE ABSORBANCIA.....	52
<b>ANEXO D</b> INFRARROJO DE UNO DE LOS MATERIALES EMPLEADOS .....	54
<b>ANEXO E</b> DATOS EXPERIMENTALES .....	56
<b>ANEXO F</b> BALANCE DE BIOMASA EN REACTOR DISCONTINUO.....	60
<b>ANEXO G</b> CRECIMIENTO MICROBIANO .....	62
<b>ANEXO H</b> PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	64

## RESUMEN

**Título:** OPTIMIZACION DE LA PRODUCCION DE BIOMASA DE MICROALGAS A ESCALA DE LABORATORIO UTILIZANDO MATERIALES COINMOVILIZANTES'

**Autores:** MARIA ALEJANDRA ROMERO ARIAS,  
JOAO ALEXANDER GARCIA LAZARO"

**Palabras claves:** Microalgas, coinmovilización, matriz, recrecimiento, *Chlorella vulgaris*, cosecha.

El cultivo de microalgas a gran escala y el uso práctico de su biomasa como una fuente de constituyentes valiosos, ha sido muy importante. Sin embargo su pequeño tamaño celular se ha constituido en obstáculo debido a las severas limitaciones descritas para el cultivo de microalgas, como solución a este problema aparecen técnicas de inmovilización celular. La inmovilización de microalgas en una variedad de matrices se establece como parte de una tendencia global y se utiliza hace más de 40 años. El objetivo de este estudio es optimizar el sistema de cultivo fijo o adherido para el crecimiento de la alga *Chlorella vulgaris* encontrando el mejor material coinmovilizante en una diversa serie de matrices orgánicos e inorgánicos.

Durante el proceso se estudiaron varios parámetros como tipo de material, tiempo de cosecha, cantidad de biomasa recuperada, tamaño del material y degradabilidad del material. Entre algunos materiales soporte se evaluaron: orgánico (loofha) e inorgánicos (poliuretano rígido, espuma de poliuretano y polietileno de baja densidad). Todos presentaban estructura porosa. La loofha condujo una difícil recuperación de biomasa debido a su estructura irregular y presentó un tiempo corto de uso debido a su degradación. La biomasa adherida en la superficie del material soporte fue cosechada por raspado; las colonias restantes sirven como inóculo para el recrecimiento. Entre los materiales inorgánicos se descartó la espuma de poliuretano debido a su alta retención de líquidos sin mostrar retención celular, como resultado final se encontró que la mayor área superficial cosechó la mayor cantidad biomasa y el sistema de crecimiento de algas fijo con polietileno de baja densidad como material soporte demostró un buen desempeño en términos de producción de biomasa, fácil para la cosecha de biomasa y físicamente resistente para su reutilización.

---

'Proyecto de Grado

"Facultad de Ingenierías Físico-Químicas Escuela de Ingeniería Química Director Viatcheslav Kafarov.

## ABSTRACT

**Title:** OPTIMIZATION OF THE MICROALGAL BIOMASS PRODUCTION AT LABORATORY SCALE USING CO-IMMOBILIZATING MATERIALS. '

**Key words:** Microalgae, co-immobilization, matrix, regrowth, *Chlorella Vulgaris*, harvest.

**AUTHORS:** MARIA ALEJANDRA ROMERO ARIAS  
JOAO ALEXANDER GARCIA LAZARO"

Microalgae culturing on a large scale and the practical use of their biomass as a source of certain constituents have been of great importance. However, the small cell size represents an obstacle due to the strong constraints defined for microalgae culturing; as a solution to this problem, new techniques of cellular immobilization have appeared. Microalgae immobilization in a variety of matrices has been established as part of a world tendency and has been used for more than 40 years. The aim of the current study is to optimize the fixed-bed cultivation system for alga *Chlorella vulgaris* growth by finding the best co-immobilizing material in a diverse group of organic and inorganic matrices.

Several parameters were considered during this process such as type of material, length of harvest, quantity of recovered biomass, size of material, and degradation of material. From a group of support materials, the following were tested to adhesion and algae harvest: organic (loofah) and inorganic (rigid polyurethane, polyurethane foam and low density polyethylene). They all showed porous structure. Loofah provided a difficult biomass recovery due to its porous structure and showed a short useful life because of its degradation. The biomass that was adhered to the support material's surface was harvest by scraping. The remaining colonies served as inoculum regrowth. From the group of inorganic materials, the polyurethane foam was dismissed due to its high water retention, not showing cellular retention. As a final result, it was found out that the biggest superficial area would harvest the biggest quantity of biomass, and the fixed-bed algae growth system with low density polyethylene as a support material also showed a good performance in terms of biomass production, a material that facilitates the biomass harvest and that is physically resistant for being reused.

---

<sup>1</sup>Graduate project.

<sup>2</sup>Faculty of Physicochemical Engineering, Chemical Engineering School. Director: Dr. Sc. Viatcheslav Kafarov

## INTRODUCCIÓN

En años recientes, se ha evidenciado fluctuaciones extensas de los precios de la energía a partir de combustibles fósiles, el cultivo de microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles ha atraído cada vez más la atención [1,2]; ya que a diferencia de las plantas superiores estos microorganismos pueden ser cultivadas rápidamente [3] y pueden acumular gran cantidad de lípidos en su biomasa y productos de alto valor agregado [2,4 - 17].

Del cultivo de microalgas, la obtención de biomasa es el principal objetivo, ya que estas tienen un extraordinario poder energético, siendo la forma más común de energía renovable, surgiendo como una alternativa de combustible teniendo en cuenta el agotamiento de los recursos no renovables [18,19], otra de sus ventajas es el uso de tierras inexplotables, evitando así la competencia por tierras cultivables [1].

Además de las aplicaciones anteriormente mencionadas, las microalgas también son utilizadas en diferentes campos como lo son: alimentos, cosméticos, la acuicultura, las industrias farmacéuticas y tratamiento de aguas residuales. Pero debido a su pequeño tamaño celular supone un problema en la aplicación de los procesos biotecnológicos [20].

Es por este motivo que surgen técnicas de coinmovilización, principalmente utilizadas para la fácil recuperación de biomasa y actualmente enfocadas en el tratamiento de aguas residuales, en la disminución de altas cantidades de nitrógeno y fosforo en ellas [21].

Existen diferentes técnicas de coinmovilización, agrupándose generalmente en pasivas y activas las cuales han sido tratadas desde finales de los ochenta. [22].

Tomando en cuenta estas consideraciones, la Universidad Industrial de Santander y el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) con apoyo del Ministerio Nacional de

Agricultura, se encuentran investigando nuevas fuentes de biomasa para la obtención de biocombustibles, con el proyecto Bioprospección de Microalgas Colombianas para la Producción de Biodiesel, código 2008D32006-6710.

En el actual trabajo se presenta el estudio de la coinmovilización de microalgas de tipo pasivo, realizando una amplia experimentación en la determinación de la mejor matriz coinmovilizante de microalgas, con el fin de lograr una alta recuperación de biomasa.

En este estudio se tuvo en cuenta la variación del tipo de material, orgánico e inorgánico hasta seleccionar el de mejor comportamiento y finalmente se tuvo en cuenta el espesor del material y el tiempo de cosecha o recolección.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1. Microalgas**

Las microalgas comprenden un amplio grupo de microorganismos fotosintéticos y heterótrofos que tienen un extraordinario potencial para cultivos energéticos. Pueden ser cultivadas en difíciles condiciones agro-climáticas y son capaces de producir una amplia gama de subproductos comercialmente interesantes, tales como grasas, aceites, azúcares y compuestos bioactivos [1, 16,23, 24; 25, 26].

Además, es importante señalar, que las microalgas desempeñan un papel clave en los ecosistemas acuáticos, pues se estima que alrededor del 40% de la fotosíntesis global es realizada por ellas [27].

Por otra parte, es necesario tener en cuenta que la utilización de microalgas ha aumentado de forma considerable en los últimos años, especialmente en áreas como la biotecnología, en la que su gran utilidad es aprovechada en múltiples áreas tales como: alimentos, cosméticos, acuicultura e industrias farmacéuticas.

La producción de biomasa de microalgas es generalmente más cara que los cultivos en crecimiento; el crecimiento fotosintético requiere de luz, dióxido de carbono, agua y sales inorgánicas. La temperatura debe mantenerse por lo general dentro de los 20 a 30°C, para lograr la minimización de los gastos la producción de biodiesel debe utilizar la luz solar disponible libremente, a pesar de las variaciones diarias y estacionales en los niveles de luz [1].

Sin embargo, el pequeño tamaño celular de las microalgas, se ha constituido en un obstáculo para su aplicación en los procesos biotecnológicos [20], en razón a esto han surgido las técnicas de coinmovilización celular que pretenden resolver este tipo de problemas.

## **1.2 Coinmovilización de microalgas.**

La coinmovilización de microalgas, como parte de una tendencia global de inmovilizar microorganismos en una variedad de matrices, se utiliza para una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas que se inició hace más de 40 años [28].

La coinmovilización de las algas ha sido usada mayoritariamente para la obtención de biomasa y remoción de macronutrientes. La extremadamente alta capacidad de acumular sustancias potencialmente peligrosas ha sido explotada [29] para técnicas de biorremediación aplicada en aguas contaminadas [5, 21, 30, 31,32]. Esta capacidad también ha sido explotada con el fin de pre-concentrar estas sustancias y luego facilitar la remoción en el medio ambiente [33].

Los países industrializados generan un gran volumen de aguas residuales urbanas e industriales, estos efluentes no se deben verter directamente a los ríos, lagos u océanos antes de realizársele un tratamiento para reducir los contaminantes a niveles ambientalmente seguros. Se requiere atención especial para las sustancias inorgánicas que favorecen el crecimiento vegetal, como el amonio, los nitratos y fosfatos, contribuyendo a la eutrofización; el uso de las algas en instalaciones de purificación para eliminar estos nutrientes ha sido ampliamente estudiado [34].

## **1.3 Concepto de coinmovilización**

Una célula coinmovilizada se define como una célula viva que, por medios naturales o artificiales, se le impide moverse con independencia de su ubicación original a todas las partes de una fase acuosa de un sistema [35].

La coinmovilización de microorganismos en soportes naturales o sintéticos proporciona estabilidad a las funciones celulares. Esta técnica permite alcanzar altas concentraciones celulares en volúmenes reducidos, también la reutilización del biocatalizador y la implantación de sistemas continuos de producción así como de alguna manera la separación facilitada de la biomasa [36].

Las microalgas son microorganismos los cuales se encuentran mayoritariamente en forma de suspensión, estos son muy eficientes en cuanto a la conversión de energía solar produciendo floraciones masivas. Durante décadas, han demostrado que pueden producir una gran variedad de metabolitos secundarios útiles [28].

Uno de los métodos sugeridos para el problema de la recolección es la coinmovilización de microalgas en los polímeros. Aunque la coinmovilización de microalgas se conoce desde hace mucho tiempo en la industria de metabolitos secundarios, históricamente, este campo de investigación surge hace poco más de 20 años con los estudios pioneros de De la Noue y sus colaboradores de Canadá, que introdujo el concepto de tratamiento de aguas residuales [37].

#### **1.4 Tipos de coinmovilización**

Seis tipos diferentes de coinmovilización se han definido: acoplamiento covalente, la inmovilización de afinidad, la adsorción, la reclusión en emulsión líquido-líquido, la captura detrás de la membrana semi-permeable, y el atrapamiento en los polímeros [22].

Estos tipos de coinmovilización pueden agruparse como "pasivos"(con la tendencia natural de microorganismos para adherirse a las superficies - apego química natural o sintética - y crecen en ellos) y "activos" (agentes floculantes, y la encapsulación de gel)

### **1.4.1 Activos**

Como se menciona anteriormente los tipos de inmovilización activos consisten en uso de agentes floculantes y encapsulación en geles de los cuales los más importantes son:

- Agentes floculantes
- Adherimiento químico
- Encapsulación de gel
  - ✓ Polímeros
  - ✓ Proteínas
  - ✓ Polisacáridos naturales

### **1.4.2 Pasivos**

Muchos microorganismos (incluyendo algunos grupos de microalgas) tienen una tendencia natural a adherirse a superficies y crecer sobre ellas [38]. Esta característica puede ser explotada con el fin de coinmovilizar las células en materiales soporte de diferentes tipos [39]. Los materiales adsorbentes para la coinmovilización pasiva pueden ser naturales o sintéticos.

#### **1.4.2.1 Matrices naturales u orgánicas**

Con respecto a los materiales adsorbentes naturales, recientemente se han hecho esfuerzos en la participación de la biomasa de la *Loofha* [40]. La inmovilización se ha desarrollado como un método alternativo que ofrece alta densidad celular y un contacto celula-celula similares a la de una planta entera [41].

## **Loofha**

La esponja de la Loofha es un material natural que consiste en una red fibrosa. Esta esponja es obtenida de frutos secos después de remover el tejido del pericarpio. Este material es no tóxico, no reactivo, barato, mecánicamente fuerte y estable en cultivos de largo plazo, la biomasa de esponja de loofha es usada con el fin de coinmovilizar células de microalgas.

Además de estas propiedades cuenta con un alto grado de porosidad, alto volumen de poros específicos y biodegradable, debido a estas excelentes características su uso como material soporte es factible.

Un problema en el diseño de investigación con la biomasa de la esponja de loofha es la repetitibilidad. La estructura del esqueleto de los frutos varía de una planta a otra en función de condiciones de cultivo, cada esponja de loofha tiene una estructura diferente [40].

### **1.4.2.2 Matrices sintéticas o inorgánicas**

Los materiales sintéticos son también extensamente usados en experimentos que involucran la coinmovilización pasiva. La inmovilización de células en polivinilo y poliuretano se ha usado para la remoción de nitratos de aguas [42].

## **Poliestireno**

Poliestireno Expandido – EPS -, es un material plástico formado por una espuma rígida de estructura celular cerrada, caracterizado por su ligereza y versatilidad.

El poliestireno es un termoplástico inerte y estable. Es imputrescible, no permite el alojamiento de bacterias ni hongos y no se descompone [43].

Entre diferentes materiales sintéticos como espuma de poliestireno, polietileno y cartón, se nota un crecimiento sobre la superficie plana y lisa, sin embargo, no

pueden mantener su estructura rígida después de un crecimiento y el ciclo de recolección [44].

### **Poliuretano**

Las espumas de poliuretano son materiales porosos que permiten la inmovilización de microorganismos por adsorción [45]. Se espera que los microorganismos se adhieran y crezcan formando un bio-película en las paredes de cada uno de los poros de la espuma [46].

Debido sus características porosas el crecimiento de las algas en la espuma de poliuretano es sustancial y es realizado dentro de los poros, en consecuencia a eso la recolección de la biomasa a partir de este material es muy difícil [44].

#### **1.4.2.3 Matrices poliméricos orgánicos e inorgánicos**

En los sistemas de inmovilización poliméricos, existe una separación física entre los microorganismos y el medio. Los microorganismos se encuentran coinmovilizados (atrapados) vivos en el polímero, porque sus poros son más pequeños que los microorganismos, mientras que el líquido fluye a través de él y mantiene su metabolismo y el crecimiento eventual [47].

La coinmovilización o la encapsulación de los microorganismos en los polímeros ejerce una presión significativa sobre los microorganismos debido a las fuerzas químicas y las interacciones entre la matriz de inmovilización y la pared celular. El confinamiento en un espacio limitado afecta el metabolismo de los microorganismos. El efecto más notable, es la reducción de la población coinmovilizada, en comparación con la población antes de la polimerización [48]. Pero las células toman un segundo período de crecimiento dentro de la matriz.

Varios sintéticos (acrilamida, poliuretano, polivinilo, resinas) y polímeros naturales derivados de polisacáridos de algas (alginato, carragenina, agar, agarosa), y el quitosano, un polisacárido de aminoácidos derivados de la quitina, ha sido utilizado experimentalmente. Independientemente de los polímeros utilizados, el material debe ser hidrofílico, lo que permite difundir las aguas. Los polímeros más utilizados son los polímeros naturales alginato y la carragenina [28].

Los polímeros sintéticos son más estables que los naturales, sin embargo algunos polímeros naturales pueden disolverse altamente en aguas contaminadas, su difusividad es mayor y son menos peligrosos para producir a diferencia de los sintéticos , no obstante los polímeros naturales son más vulnerables a la degradación del medio ambiente por los microbios [49]

## **2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

### **2.1. Objetivo del experimento.**

Se tiene como objetivo encontrar el mejor material coinmovilizante de células de microalgas. Confrontar la información de los experimentos y materiales referenciados en la literatura [44], siendo estos los que tuvieron un mejor comportamiento adsorbente. A demás se analizará el crecimiento de la microalga en las diferentes matrices.

### **2.2. Materiales**

#### **2.2.1 Inoculo**

Se trabajo con una microalga verde, *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, perteneciente a Phylum Chlorophyta, Orden Chlorellales obtenida de la colección de cultivo de algas en la Universidad de Texas (Austin, Tex, USA). La microalga se mantuvo en crecimiento en medio Bold Basal, (Anexo A) a 27°C, y pH 8, el cultivo se mantuvo agitado con aireación constante a 2 psi.

#### **2.2.2. Biorreactor**

Durante toda la experimentación se utilizaron botellas de plástico de capacidad de 2.5 L cada una con un volumen de trabajo de 1.5 litros.

#### **2.2.3. Cultivo de microalga**

Para cada una de las etapas de experimentación se inocularon 0.0043g/L de microalgas a cada uno de los reactores

## **2.3 Caracterización**

### **2.3.1 Calculo de Peso Seco**

Se tomaron 3 ml del inoculo los cuales fueron secados en horno (binder 500, Anexo B, Figura B1) durante 24 horas a 105 °C, después de retirar el agua de la muestra, se mantuvieron en un desecador a temperatura constante durante 12 horas (Anexo B, Figura B2) para luego ser pesados (Balanza Anexo B, Figura B3). Dicho peso constituye la concentración inicial de células y la base para el cálculo del coeficiente de extinción másico.

### **2.3.2 Medición de la Absorbancia**

Del montaje realizado se tomaban muestras de 6 ml cada 12 h, esta era diluidas sucesivamente con agua destilada a 4 muestras más adicionando 3 ml de agua destilada a cada uno de ellos, con el fin de preparar las muestras que luego serian usadas para la medición de la absorbancia con un espectrofotómetro (Spectroquant 300 Merck, Anexo B, Figura B4) a una longitud de onda de 500nm. La concentración de cepa fue determinada según la ley de Beer-Lambert (Anexo C):

$$\text{Abs} = KXL$$

Abs: La absorbancia;

K: Coeficiente de extinción molar;

X: Concentración;

L: Distancia que viaja la luz a través de la muestra.

## 2.4. Descripción de la etapa 1

En la primera etapa del experimento se busca conocer el crecimiento de la microalga en condiciones óptimas, para esto se realiza el montaje de cuatro biorreactores con su respectiva preparación de medio (Bold basal médium) y seguidamente se adiciona el inóculo, estos son caracterizados mediante dos pruebas diferentes, peso seco y absorbancia. Se calcula el coeficiente de extinción másico.

## 2.5. Descripción de la etapa 2

En esta etapa se escogen dos de los mejores materiales encontrados en la literatura uno de ellos orgánico y el otro inorgánico, siendo respectivamente la esponja de loofha y el poliestireno.

Se busca obtener el mejor material adsorbente variando el tiempo de recolección de biomasa de 5, 10 y 15 días, durante 15 días de corrida de la siguiente manera:

Tabla 1 Modelo experimental de etapa 2

Reactores	Material Orgánico	Material Inorgánico
5 Días	3 cosechas de biomasa	3 cosechas de biomasa
10 Días	1 cosechas de biomasa	1 cosechas de biomasa
15 Días	1 cosechas de biomasa	1 cosechas de biomasa

Se cortaron tres piezas de igual tamaño para cada material, estos seis cortes inicialmente fueron inoculados durante siete días con una alta concentración de biomasa. Al cabo del tiempo estipulado se preparó un medio de cultivo de 2 litros para cada uno de ellos.

## 2.6. Descripción de la etapa 3

Debido a que el comportamiento del material inorgánico no es el esperado se debe seleccionar otro, por esta razón se eligen tres nuevos materiales (espuma de poliuretano, poliuretano rígido y espuma de polietileno de baja densidad (Anexo D)) y se analiza el crecimiento de la microalga en ellos para elegir el mejor durante el periodo de inoculación del material.

## 2.7. Descripción de la etapa 4

Teniendo en cuenta los resultados de la etapa anterior, se seleccionaron dos materiales (poliuretano rígido y polietileno de baja densidad) en los cuales se decide evaluar por duplicado la influencia del espesor del material (1cm, 2cm y 4cm) en el crecimiento y recrecimiento celular (5 días, 10 días y 15 días).

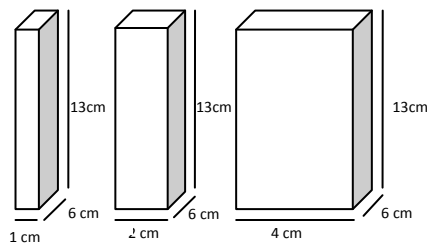


Figura 1 Tamaño del material

Tabla 2 Modelo experimental de etapa 4

Reactores	Polímero A						Polímero B					
	1 cm		2 cm		4 cm		1 cm		2 cm		4 cm	
<b>5 Días</b>	g O	g C	g O	g C	g O	g C	g O	g C	g O	g C	g O	g C
<b>10 Días</b>	g O	g C	g O	g C	g O	g C	g O	g C	g O	g C	g O	g C
<b>15 Días</b>	g O	g C	g O	g C	g O	g C	g O	g C	g O	g C	g O	g C

## 2.8 Diagrama de bloques de la metodología experimental

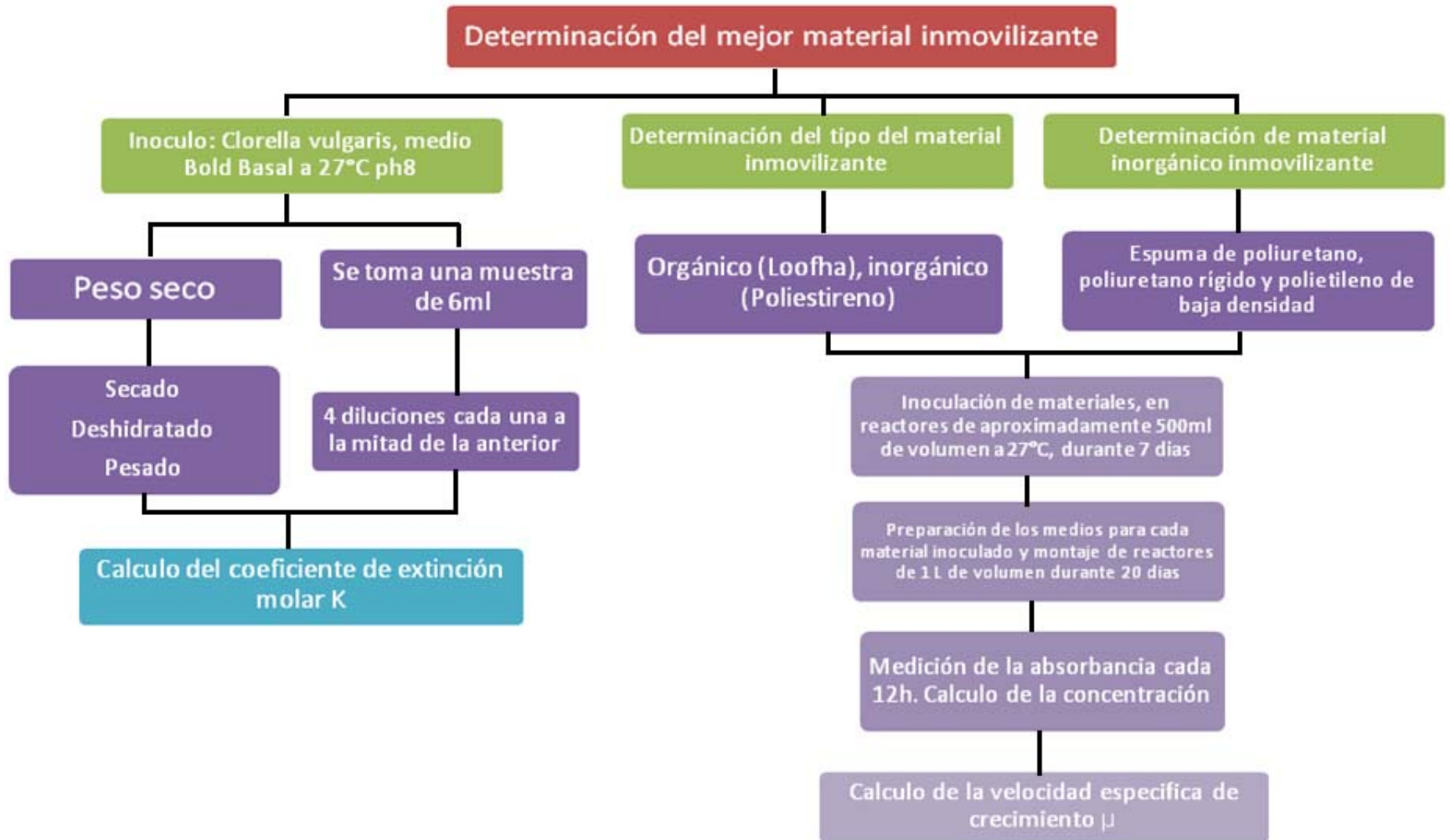


Figura 2 Diagrama de bloques de la metodología experimental

### 3. RESULTADOS Y ANALISIS

#### 3.1 Resultados y análisis de la Etapa 1

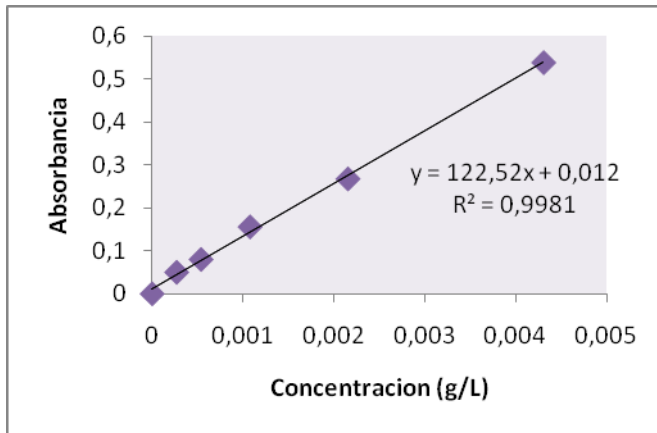


Tabla 3 Variación de la absorbancia con la concentración del inoculo

Concentración (g/L)	Absorbancia
0	0
0,0043005	0,539
0,00215025	0,268
0,001075125	0,156
0,000537563	0,080
0,000268781	0,050

Figura 3 Cálculo del coeficiente de extinción molar

La figura 3 ilustra la relación existente entre la absorbancia y la concentración del cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* en condiciones normales según la ley de Beer-Lambert, ésta es graficada con los datos obtenidos de la tabla 3. La relación se expresa a través del coeficiente de extinción másico donde la pendiente de la recta indica su valor:

Coeficiente de extinción másico ( $K$ )=122.5, una vez calculado este valor se procede a calcular las respectivas concentraciones y seguidamente la velocidad específica de crecimiento.

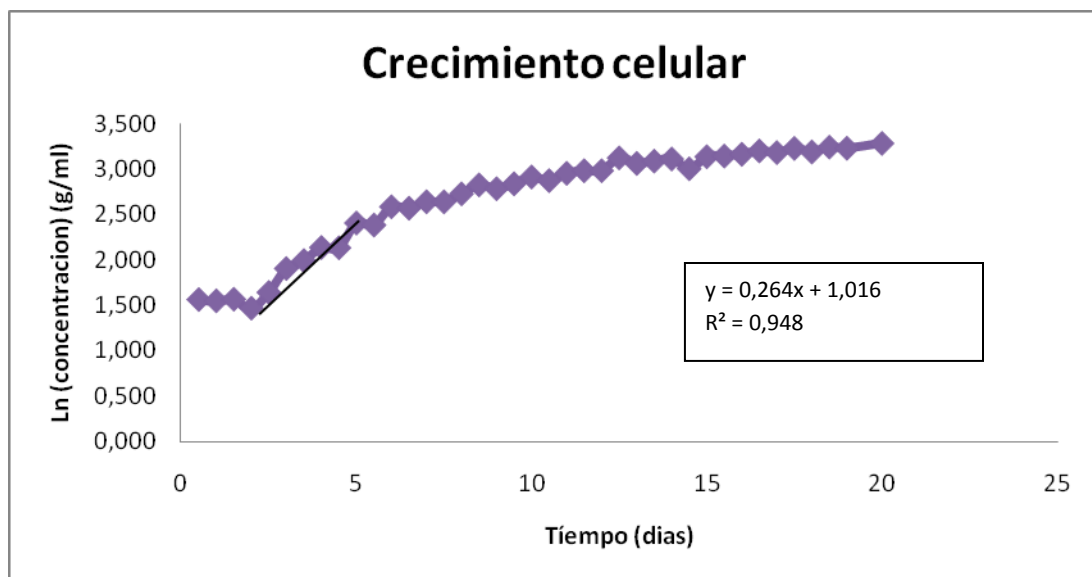


Figura 4 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento

La figura 4 representa el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*, donde se determinó la velocidad específica con que crecían los microorganismos libres en el medio a través de la pendiente de la ecuación de la línea recta; la grafica obedece a los datos presentados en el anexo E, Tabla E1.

La Velocidad específica de crecimiento ( $\mu=0.264 \text{ d}^{-1}$ ), se calculo a partir del balance de biomasa en un reactor discontinuo (Anexo F).

### 3.2 Resultados y análisis de la Etapa 2

Tabla 4 Medida de absorbancia a los reactores que contienen la matriz de loofha durante el tiempo determinado

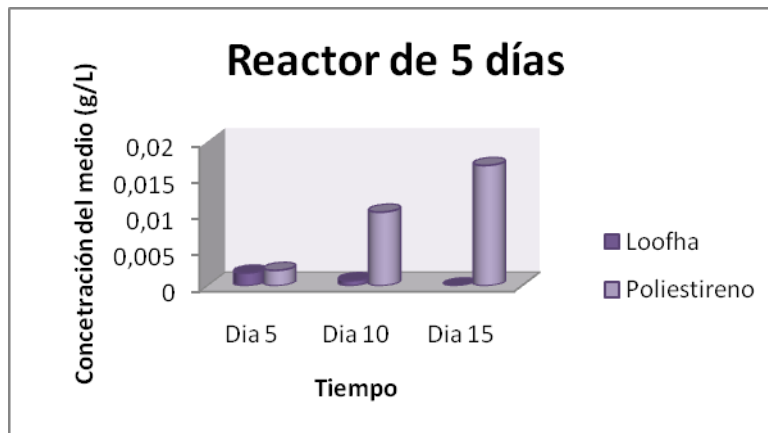
		LOOFHA					
Tiempo	Reactores	MUESTRA	1	2	3	4	Concentración del medio (g/L)
DIA 5	5 días	0,230	0,141	0,082	0,051	0,026	0,001779592
DIA 10	5 días	0,101	0,044	0,017	0,001	0,000	0,000726531
	10días	0,198	0,097	0,068	0,024	0,002	0,001518367
DIA 15	5 días	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	15días	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

**Tabla 5 Medida de absorbancia a los reactores que contienen la matriz de poliestireno durante el tiempo determinado**

POLIESTIRENO							
Tiempo	Reactores	MUESTRA	1	2	3	4	Concentración del medio (g/L)
DIA 5	5 días	0,275	0,151	0,120	0,089	0,066	0,002146939
DIA 10	5 días	1,265	0,683	0,357	0,182	0,080	0,010228571
	10 días	2,059	1,191	0,646	0,327	0,177	0,016710204
DIA 15	5 días	1,990	1,147	0,612	0,327	0,171	0,016146939
	15 días	2,152	1,240	0,715	0,399	0,227	0,017469388

Las tablas 4 y 5 muestran el crecimiento de las microalgas en el medio, en el cual está presente una matriz inmovilizante, la loofha y el poliestireno respectivamente. Se indica el crecimiento en un periodo de tiempo de 15 días con tres momentos de medición 5, 10 y 15 días, a los seis reactores del experimento. Ver procedimiento experimental. (Anexo H, H2 Y H3).

La representación grafica de estos resultados se muestra a continuación:



**Figura 5 Concentración en el medio para los reactores de 5 días de los dos materiales durante el tiempo de corrida**

La figura 5 indica el crecimiento de las microalgas en un reactor determinado (5D) el cual se denomina así según el ciclo de tiempo a cosechar (Cada 5 días). Se puede deducir para cada material lo siguiente:

En el reactor 5D de loofha la concentración del medio disminuyó lo cual indica que el crecimiento se está presentando en el material y este mismo está adsorbiendo los microorganismos para que su desarrollo se presente allí y no en el medio.

En el reactor 5D de poliestireno la concentración del medio aumentó lo que indica que no hay adhesión de los microorganismos en el material y estos crecen libremente donde su función como coimmobilizante es nula.

Para hacer el análisis de recolección o cosecha de biomasa se obtuvieron los siguientes resultados:

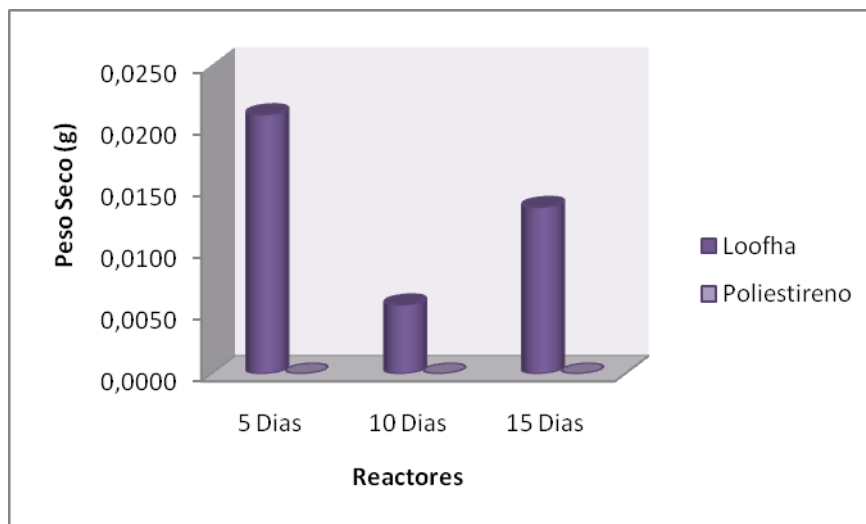


Figura 6 Cantidad de biomasa recuperada adherida al material

Tabla 6 Biomasa en gramos (g) que se obtuvo en total de cada una de las matrices en su respectivo biorreactor

Biomasa recuperada (g)			
Reactores	5 Días	10 Días	15 Días
Loofha	0,0210	0,0056	0,0135
Poliestireno	0,0000	0,0000	0,0000

En la figura 6 se muestra la cantidad de biomasa recuperada en los dos materiales, notándose una diferencia drástica entre ellos ya que demuestra la no capacidad de adsorción del poliestireno.

Se logra la mayor recuperación de biomasa en el reactor de 5 días, esto es debido al recrecimiento de las microalgas en la matriz, porque en una corrida de 15 días sufre tres cosechas de biomasa evitando el tiempo inicial de inoculación y adaptación en el material. A diferencia del reactor de cinco días los reactores de 10 y 15 días solo sufren una cosecha de biomasa, entonces nos señala que entre más tiempo de permanencia de la matriz en el medio el crecimiento de las microalgas será mayor hasta que se alcance la saturación del material o la muerte celular. Teniendo en cuenta los resultados anteriores es descartado el poliestireno.

Durante el experimento se apreció que la cosecha de biomasa en la loofha tiene un alto grado de dificultad debido la formación de colonias dentro de los poros irregulares de la matriz.

Así mismo debe tenerse en cuenta que en el momento de cosecha la matriz pudo haberse causado algún daño, afectando los datos obtenidos de cantidad de biomasa recuperada. Ver figura 7.

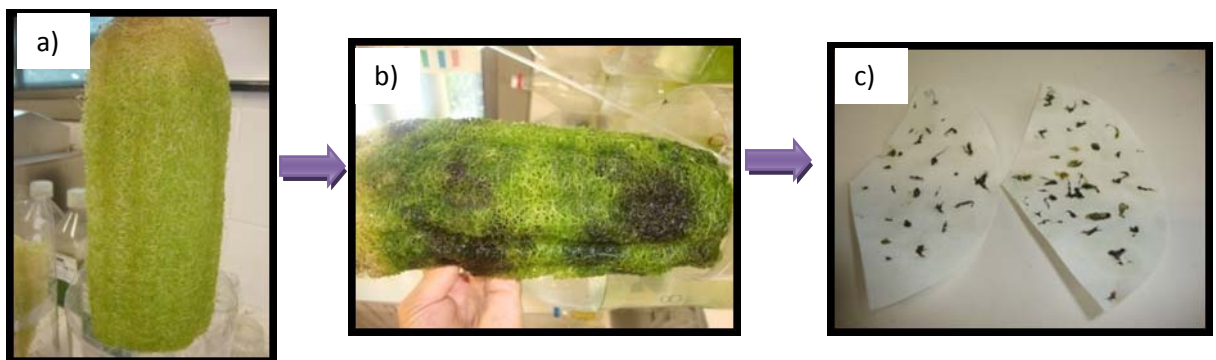


Figura 7 a) inoculación del material. b) Crecimiento de microalgas en el material y posterior c) cosecha

También se apreció que la loofha al final de la corrida del experimento sufría una alta degradación y se produjo muerte celular; lo cual la hace un material inviable para la selección de matrices inmovilizantes ya que no es reutilizable a largo plazo. Ver figura 8.

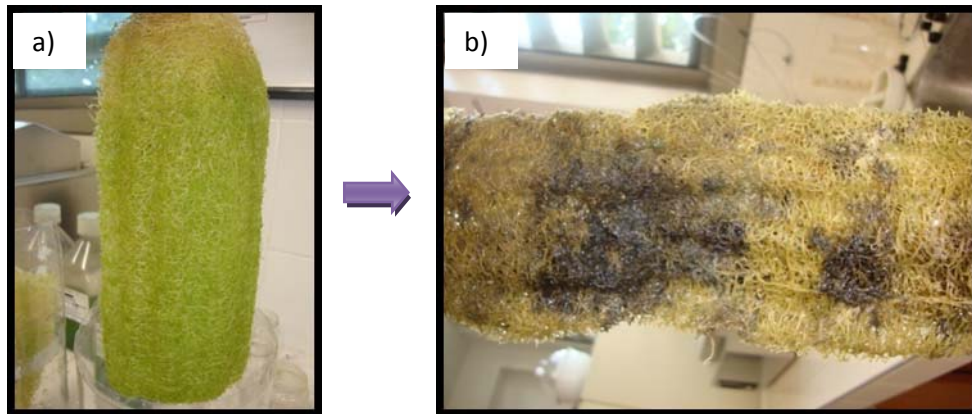


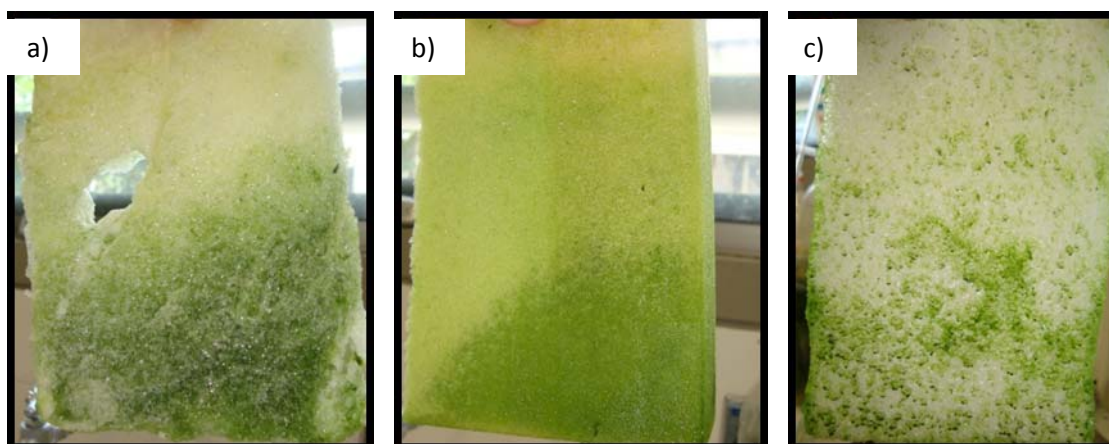
Figura 8 a) inoculación del material. b) Degradación del material al cabo de 15 días.

### 3.3 Resultados y análisis de la Etapa 3



Figura 9 a) poliuretano rígido b) espuma de poliuretano c) polietileno de baja densidad

Una vez descartado el poliestireno se emprendió la búsqueda del material inorgánico que contara con las características adecuadas como matriz inmovilizante, en la figura 9 se encuentran tres materiales preseleccionados para dicha labor; éstos se utilizaron ya que presentan una estructura polimérica similar al del poliestireno.



**Figura 10** Materiales inoculados a) poliuretano rígido b) espuma de poliuretano c) polietileno de baja densidad

La figura 10 muestra como las células de microalgas se depositan al cabo del tiempo de inoculación en los poros de los materiales; según estos resultados, es descartado el material b) debido a su alta retención de líquidos, sin mostrar retención celular. De esta manera se selecciono el poliuretano rígido (figura 10. a)) y el polietileno de baja densidad (figura 10. b)) para la siguiente etapa.

### 3.4 Resultados y análisis de la etapa 4

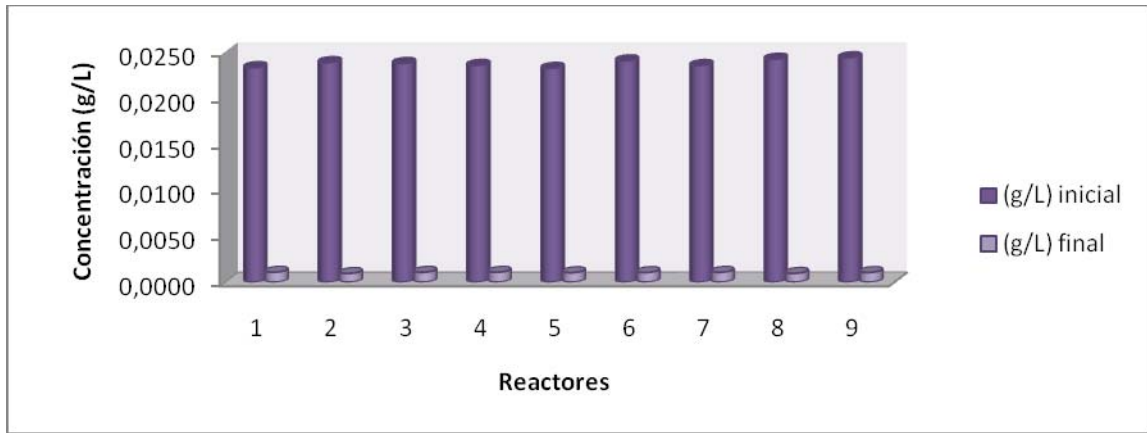
#### 3.4.1 Polímero A: Poliuretano rígido

**Tabla 7** Datos de la inoculación del poliuretano en 9 reactores por 7 días.

POLIURETANO RIGIDO									
	R 1	R2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 7	R 8	R 9
<b>Absorbancia</b>	2,865	2,933	2,922	2,896	2,857	2,957	2,894	2,978	2,998
<b>(g/L) Inicial</b>	0,0233	0,0238	0,0238	0,0235	0,0232	0,0240	0,0235	0,0242	0,0244
<b>(g/L) final</b>	0,0011	0,0009	0,0011	0,0011	0,0010	0,0010	0,0011	0,0010	0,0011

La tabla 7 expresa la concentración inicial y final de los 9 reactores en la etapa de inoculación, mostrando la capacidad de adsorción del poliuretano rígido (Anexo H, H4), encontrándose una disminución celular en el medio expresada a través de la

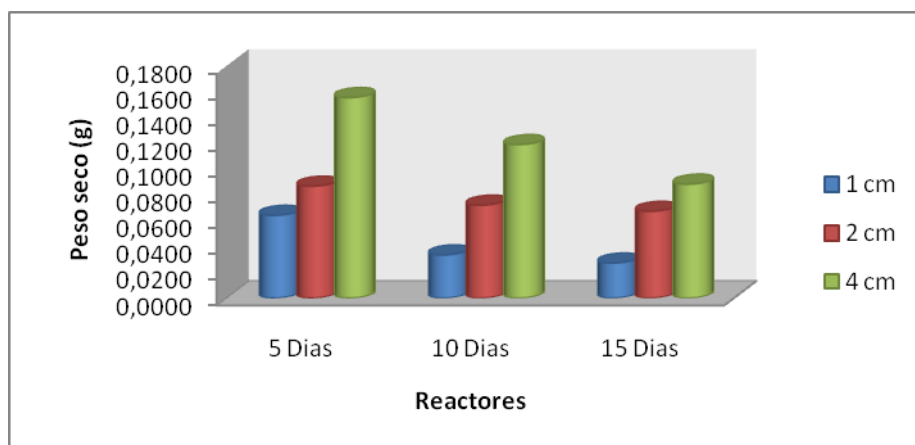
concentración, lo cual indica su buen desempeño en la inmovilización de microalgas. Ver figura 11.



**Figura 11 Inoculación del poliuretano rígido**

La figura 12 representa la cantidad de biomasa (g) obtenida de las 9 piezas de poliuretano. Los reactores denominados 5 días recolectaron mayor cantidad de biomasa debido a que se realizaron tres cosechas durante el tiempo de corrida, aprovechando las colonias ya formadas logrando un mayor desempeño en el crecimiento.

También se puede observar que a mayor área superficial existe mayor recuperación de microalgas, es decir, los reactores que trabajan con una matriz de 4cm logran un mayor rendimiento.



**Figura 12 Cantidad de biomasa recuperada del poliuretano.**

Otra observación que se puede realizar respecto a la figura 12 es que los reactores de 10 y 15 días que sufren una sola cosecha tienen aproximadamente la misma recuperación de biomasa, debido que a partir del día 10 la matriz se satura y la capacidad de las células de adherirse al material se detiene. Se puede notar que existe una pequeña diferencia entre los reactores que contienen la matriz de 4cm de espesor esto se debe a ruido presentado por la degradación del material en matrices con mayor tamaño.



**Figura 13 a) extracción de biomasa del material b) material al finalizar la cosecha**

Según la figura 13 se puede evidenciar la degradación del material, lo cual provoca errores en los datos que expresan la cantidad de biomasa cosechada ya que en la medición no solo se encuentran microalgas sino también restos del mismo. Ver figura 14.



**Figura 14 Tubos de ensayo con la biomasa seca.**

### 3.4.2 Polímero B: Polietileno de baja densidad

Tabla 8 Datos de la inoculación del polietileno de baja densidad en 9 reactores por 7 días

POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD									
	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 7	R 8	R 9
<b>Absorbancia</b>	2,442	2,433	2,514	2,442	2,307	2,489	2,313	2,443	2,433
<b>(g/L) inicial</b>	0,0198	0,0198	0,0204	0,0198	0,0187	0,0202	0,0188	0,0198	0,0198
<b>(g/L) final</b>	0,0064	0,0059	0,0058	0,0061	0,0060	0,0065	0,0062	0,0058	0,0058

La tabla 8 muestra la capacidad de adsorción del polietileno de baja densidad en la etapa de inoculación (Anexo H, H5), encontrándose una disminución celular en el medio expresada a través de la concentración, lo cual indica su buen desempeño en la inmovilización de microalgas. Ver figura 15. Es importante mencionar la comparación con el polímero anterior, donde se puede observar que la concentración inicial del inoculo es mayor para el poliuretano rígido que para el polietileno de baja densidad, sin embargo las diferencias existentes entre la disminución de concentración entre los polímeros es representativa, por lo tanto se puede afirmar que el poliuretano rígido tiene mayor habilidad adsorbente.

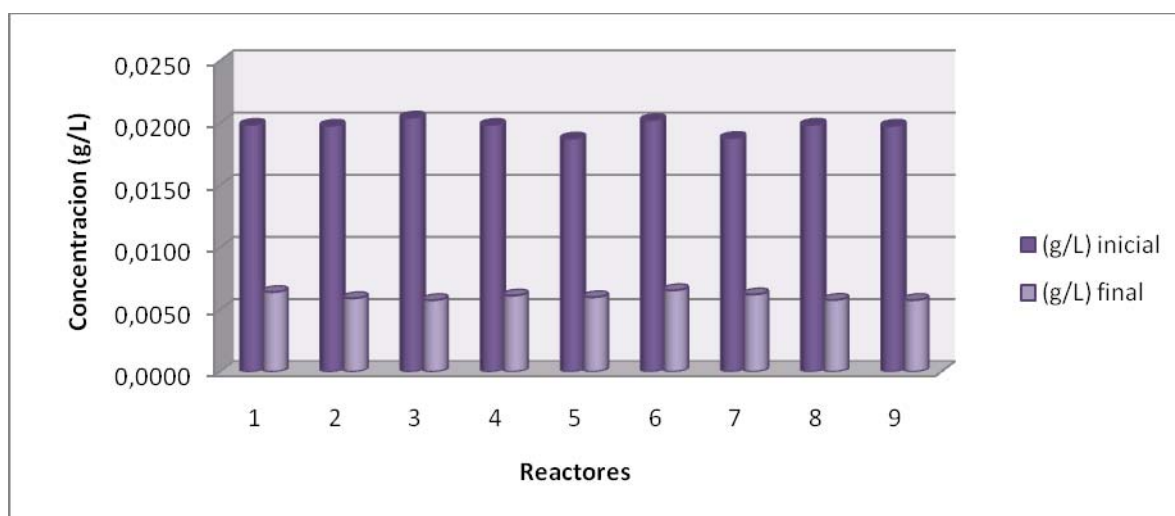


Figura 15 Inoculación del polietileno de baja densidad

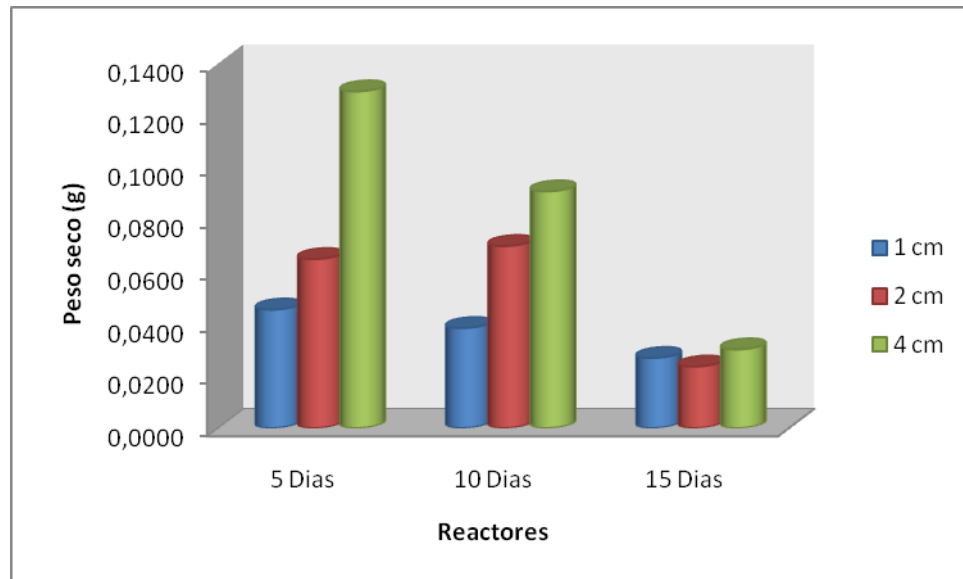
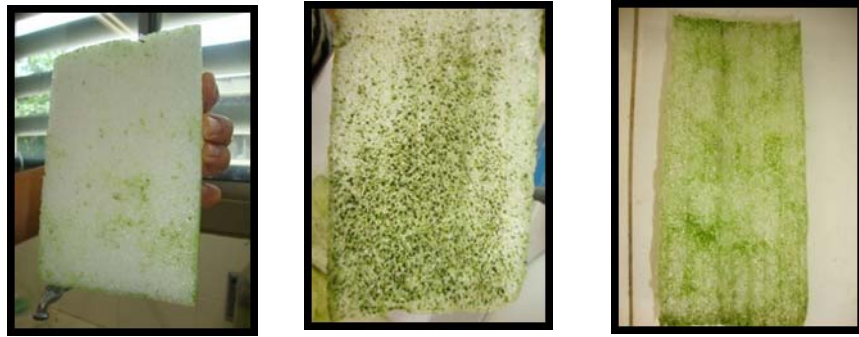


Figura 16 Cantidad de biomasa recuperada del polietileno de baja densidad.

La figura 16 representa la cantidad de biomasa (g) obtenida de las 9 piezas de polietileno de baja densidad. Los reactores denominados 5 días recolectaron mayor cantidad de biomasa debido a que se realizaron tres cosechas durante el tiempo de corrida a diferencia de los otros reactores que solo sufrieron una cosecha, además aprovechando las colonias ya formadas, eliminando el tiempo requerido de adaptación en la matriz.

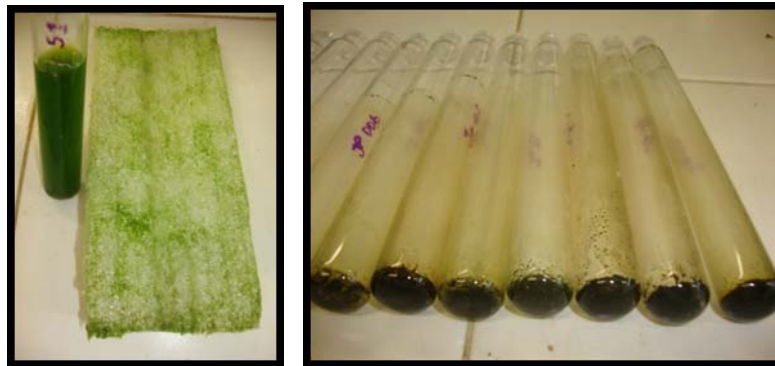
También se puede observar que a mayor área superficial existe mayor recuperación de microalgas, es decir, los reactores que trabajan con una matriz de 4cm logran un mayor rendimiento, al igual que con el poliuretano rígido.

A diferencia del material anterior el polietileno de baja densidad no sufre degradación alguna, al terminar el ciclo de corrida se puede decir que queda casi intacto, por lo tanto reutilizable. Ver figura 17.



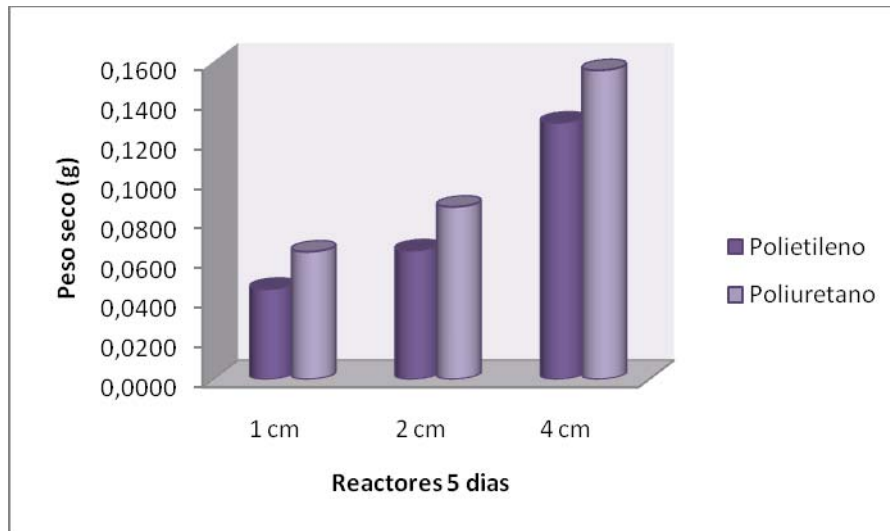
**Figura 17 Polietileno de baja densidad en el transcurso del experimento**

Al observar la recuperación de biomasa alcanzada con este material se logra evidenciar que es la mejor de todas debido a que no hay ningún error en los datos obtenidos de la cosecha de biomasa por la inexistencia de degradación del material. Ver figura 18.



**Figura 18 Recuperación de biomasa el polietileno de baja densidad**

La figura 19 representa la comparación de cosecha de biomasa entre los dos polímeros empleados (poliuretano rígido y polietileno de baja densidad), utilizando los reactores en los cuales se presentaba recrecimiento debido a que eran los que otorgaban los resultados más notorios. Como era de esperarse el que alcanzó una mayor recuperación de biomasa fue el poliuretano rígido ya que como se menciono anteriormente tenia la mayor habilidad adsorbente.



**Figura 19** Obtención de biomasa entre los dos polímeros.

## CONCLUSIONES

Se encontró que el material inorgánico polietileno de baja densidad es el mejor de todo el proceso; aunque su capacidad de adhesión sea baja comparada con los demás materiales utilizados, su cosecha presenta buenos resultados y con alta calidad. Además su vida útil es la más larga de todas las matrices empleadas debido a que no presenta degradación durante el proceso y su reutilización es viable.

A través de los experimentos realizados se comprobó que la cosecha de biomasa en los materiales inorgánicos presenta una gran facilidad en comparación con el material orgánico debido a la característica porosa de éste y al crecimiento sustancial dentro de los poros. Sin embargo la loofha resultó ser un muy buen material inmovilizante ya que las células de microalgas se adherían a su estructura porosa con gran facilidad.

Al comparar los materiales inorgánicos poliuretano rígido y polietileno de baja densidad se puede observar que se obtuvo mayor cantidad de biomasa recolectada por parte del poliuretano rígido pero no se tuvo en cuenta que su degradación pudo causar errores significativos en esta medida, obteniendo biomasa de baja calidad, es decir, que se recupere mayor cantidad de biomasa no implica que sea óptimo para este proceso ya que la degradación de los materiales produce cosecha de baja calidad la cual va a sufrir otro proceso de separación para alcanzar la calidad deseada, además la no reutilización de la matriz y en algunos casos muerte celular.

## **RECOMENDACIONES**

Realizar pruebas a escala laboratorio utilizando polietileno de baja densidad como bio-filtro para el tratamiento de aguas residuales aprovechando sus habilidades conmovilizantes además de su durabilidad.

Es recomendable implementar este método de cultivo utilizando el polietileno de baja densidad, ya que se logra una mayor bio-aumentación de la biomasa comparado con los métodos de cultivo tradicionales.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294-306
- [2] Baum R (1994) Microalgae are possible source of biodiesel fuel.
- [3] Chisti Y, Response to Reijnders: Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants? 2008, Massey University, Private Bag 11 222, Palmerston North, New Zealand.
- [4] Metting B, Pyne JW. Biologically-active compounds from microalgae. *Enzyme Microb Technol* 1986;8:386–94.
- [5] Schwartz RE. Pharmaceuticals from cultured algae. *J Ind Microbiol* 1990;5:113–23.
- [6] Kay RA. Microalgae as food and supplement. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1991;30:555–73.
- [7] Shimizu Y. Microalgal metabolites: a new perspective. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:431–65.
- [8] Borowitzka MA. Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. In: Cohen Z, editor. *Chemicals from microalgae*. Taylor & Francis; 1999. p. 313–52.
- [9] Ghirardi ML, Zhang JP, Lee JW, Flynn T, Seibert M, Greenbaum E, et al. Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>. *Trends Biotechnol* 2000;18:506–11.
- [10] Akkerman I, Janssen M, Rocha J, Wijffels RH. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1195–208.
- [11] Banerjee A, Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit Rev Biotechnol* 2002;22:245–79.

- [12] Melis A. Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1217–28.
- [13] Lorenz RT, Cysewski GR. Commercial potential for *Haematococcus* microalga as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol* 2003;18:160–7.
- [14] Metzger P, Largeau C. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;66:486–96.
- [15] Singh S, Kate BN, Banerjee UC. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit Rev Biotechnol* 2005;25:73–95.
- [16] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 2006;101:87–96.
- [17] Walter TL, Purton S, Becker DK, Collet C. Microalgae as bioreactor. *Plant Cell Rep* 2005;24:629–41.
- [18] Miao, X.L., Wu, Q.Y., 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J. Biotechnol.* 110, 85–93.
- [19] Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 629–636.
- [20] Borowitzka, M.A., Borowitzka, J.L., 1988. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- [21] Greene, B., Bedell, G.W., 1990. Algal gels or immobilized algae for metal recovery. In: Akatsuka, I. (Ed.), *Introduction to Applied Phycology*. SPB Academic Publishing BV, The Hague, The Netherlands, pp. 137– 149.
- [22] Mallick Nirupama, *Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review*, 2002

- [23] KRAUSS, Robert, Mass culture of algae for food and other organic compounds. *American Journal of Botany*, Vol. 49, No. 4 (Apr., 1962), pp. 425-435.
- [24] Becker E.W., (1994), *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge.
- [25] Olaizola M., (2003), *Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace*, *Biomolecular Eng.*, **20**, 459–466.
- [26] Walker T.L., Purton S., Becker D.K., Collet C., (2005), *Microalgae as bioreactor*, *Plant Cell Rep.*, **24**, 629–641.
- [27] Falkowsky, P.G., 1980. Primary productivity in the sea. In: Falkowski, P.G. (Ed.), *Environmental Science Research*, vol. 19. Plenum Press, New York/London.
- [28] MORENO-GARRIDO Ignacio, 2008. Microalgae immobilization: Current techniques and uses.
- [29] Maeda, S., Sakaguchi, T., 1990. Accumulation and detoxification of toxic elements by algae. In: Akatsuka, I. (Ed.), *Introduction to Applied Phycology*. SPB Academic Publishing BV, The Hague, The Netherlands.
- [30] Suresh B, Ravishankar GA. Phytoremediation — a novel and promising approach for environmental clean-up. *Crit Rev Biotechnol* 2004;24:97–124.
- [31] Kalin M, Wheeler WN, Meinrath G. The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. *J Environ Radioact* 2005;78:151–77.
- [32] Munoz R, Guieysse B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res* 2006;40:2799–815.
- [33] Carrilho, E.N.V.M., No´brega, J.A., Gilbert, T.R., 2003. The use of silicaimmobilized brown alga (*Pilayella littoralis*) for metal preconcentration and determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* 60, 1131–1140.

- [34] Kaya, V.M., Picard, G., 1996. Stability of chitosan gel as entrapment matrix of viable *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on screens for tertiary treatment of wastewater. *Biores. Technol.* 56, 147±155.
- [35] Tampion J, Tampion MD. 1987 *Immobilized Cells: Principles and Applications*. Cambridge UK: Cambridge University Press; 257 pp.
- [36] Duran-Parramo, E. et al (2000), *Appl. Biochem. Biothechnol.* 84-86, 479-485)
- [37] Chevalier P, de la Noüe J. 1985b Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphorus removal from wastewater. *Biotechnol Lett* 7, 395–400.
- [38] Robinson, P.K., Mak, A.L., Trevan, M.D., 1986. Immobilized algae: a review. *Process Biochem.* (August), 122–126.
- [39] Codd, G.A., 1987. Immobilized micro-algae and cyanobacteria. *Br. Phycol. Soc. Newslett.* 24, 1–5.
- [40] Liu, Y.K., Seki, M., Tanaka, H., Furusaki, S., 1998. Characteristics of loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for plant cell immobilization. *J. Ferment. Bioeng.* 85, 416–421.
- [41] Shuler, M. L., Hallsby, G. A., Payne, J. W., and Cho, T.: *Bioreactors for immobilized plant cell cultures.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 623, 270-278 (1986).
- [42] Urrutia, I., Serra, J.L., Llama, M.J., 1995. Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilizes in polymeric foams. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 200–205.
- [43] Fred W. Billmeyer, Jr, *Ciencia de los polímeros*, 2008. 409 p)
- [44] Johnson Michael y Wen Zhiyou , *Development of an attached microalgal growth system for biofuel production*, 2010

- [45] Hu, Z.; Korus, R.; Levinson, W. 1994. Adsorption and Biodegradation of Pentachlorophenol by Polyurethane-Immobilized Flavobacterium. En: Environmental Science Technology. Moscow, Idaho, 28 (3): 491-496.
- [46] Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; Debeer, D. 1994 Biofilms, the customized microniche. Journal of Bacteriology, 176, (8): 2137-2142.
- [47] Cohen, Y. (2001). Bio-filtration "The treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material" A review. Biores. Technol. 77, 257–274.
- [48] De-Bashan, L.E., Hernández, J.P., Morey, T., Bashan, Y., 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. Water Res. 38, 466–474.
- [49] Leenen, E.J.T.M., dos Santos, V.A.P., Grolle, K.F.C., Tramper, J., Wijffels, R.H., 1996. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. Water Res. 30, 2985–2996.
- [50] Diaz Nieves, Barcena Antonio, Reyes Emilio, Galvan Aurora, Jorin Jesus, Peinado Jose, Toribio Fermin, Tenez Isaac. Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación calorimétrica de biomoléculas.
- [51] Richter, G (1972) Fisiología del metabolismo de las plantas. P 105-120

## ANEXOS

### ANEXO A COMPOSICION DEL MEDIO

Composición del medio Bold Basal

Soluciones Stock	Para 400 ml
(1). NaNO <sub>3</sub>	10.0 g
(2). MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.0 g
(3). NaCl	1.0 g
(4). K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.0 g
(5). KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.0 g
(6). CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.0 g
Soluciones Stock	Para un Litro
(7). Solución de elementos de traza (autoclave para disolverse): ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.82 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.44 g
MoO <sub>3</sub>	0.71 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1.57 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.49 g
(8). H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11.42 g
(9). EDTA	50.0 g
KOH	31.0 g
(10). FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4.98 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (concentrado)	1.0 ml
Medio	Para un Litro
Soluciones Stock 1 - 6	10 ml cada una
Soluciones Stock 7 - 10	1 ml cada una

## ANEXO B MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS

**Figura B1.** Horno

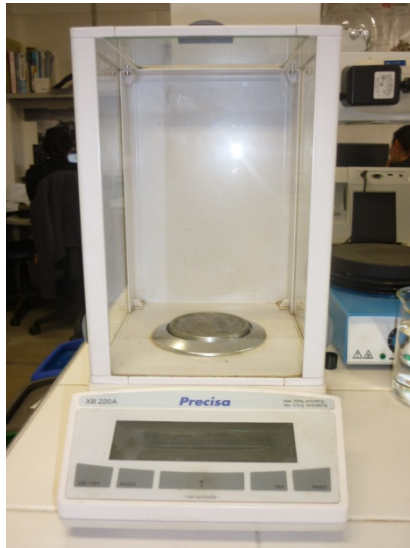


El secado de la muestra para el cálculo del peso seco se realizó en un horno Binder 500 a 105 °C, maneja un rango de temperatura de 5 °C por encima de la temperatura ambiente hasta 300 °C, temporizador electrónico 0 – 99.59 h, controlador de microprocesador con display LED y temporizador integrado.

**Figura B2.** Deshidratador



**Figura B3.** Balanza



**Figura B4.** Espectrofotómetro

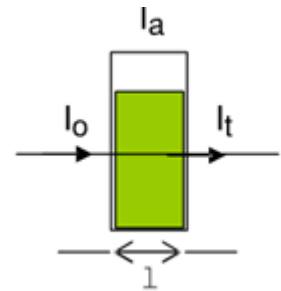


La absorbancia se midió por medio de un espectrofotómetro Spectroquant 300 Merck con un rango de longitud de onda de 190-1100 nm, ancho de banda espectral 4 nm lámpara de destello de xenón y una resolución de absorbancia de 0.001 A.

## ANEXO C GENERALIDADES ACERCA DE ABSORBANCIA

### ABSORBANCIA (A)

Es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de  $1/T$ , en consecuencia:  $A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t/I_0$ .



Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ( $I_t = I_0$ ), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces  $A$  vale  $\log 1 = 0$ .

### Ley de Lambert-Beer

Esta ley expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución.

$$A = \log I_0/I_t = \epsilon \cdot c \cdot l$$

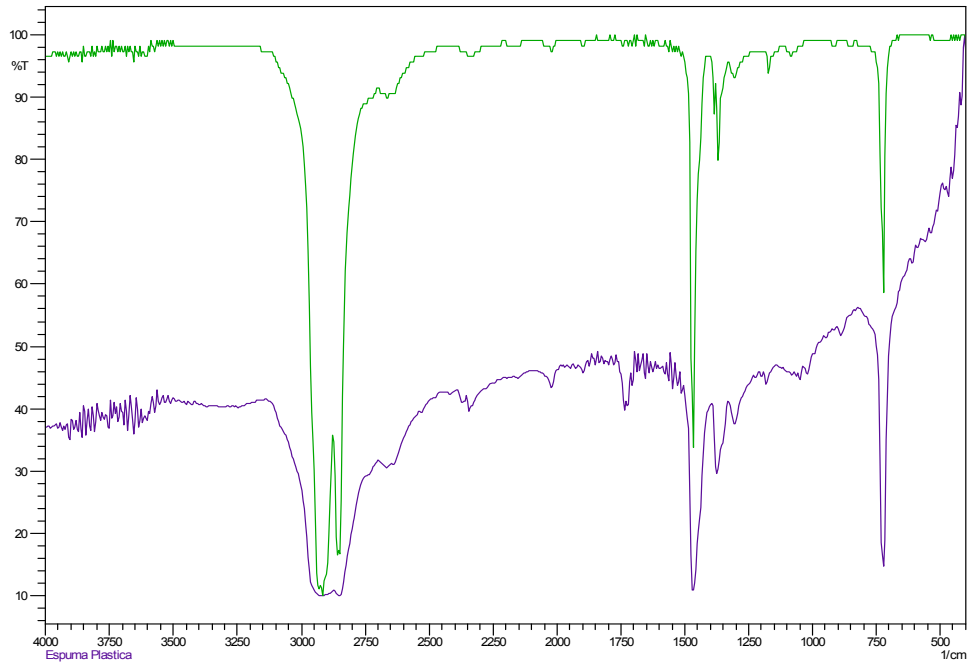
La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración, a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución, a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará; y por último, depende de  $\epsilon$ , una constante de proporcionalidad, denominada coeficiente de extinción, que es específica de cada cromóforo. Como  $A$  es adimensional, las dimensiones de  $\epsilon$  dependen de la  $c$  y  $l$ . La segunda magnitud ( $l$ ) se expresa siempre en cm mientras que la primera ( $c$ ) se hace, siempre que sea posible, en M, con lo que las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ . Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar (o un

submúltiplo apropiado), se denomina coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_M$ ). Cuando, por desconocerse el peso molecular del soluto, la concentración de la disolución se expresa en otras unidades distintas de M, por ejemplo  $g \cdot L^{-1}$ , las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser distintas, por ejemplo  $g^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$ , y al coeficiente así expresado se denomina coeficiente de extinción específico ( $\epsilon_s$ ).

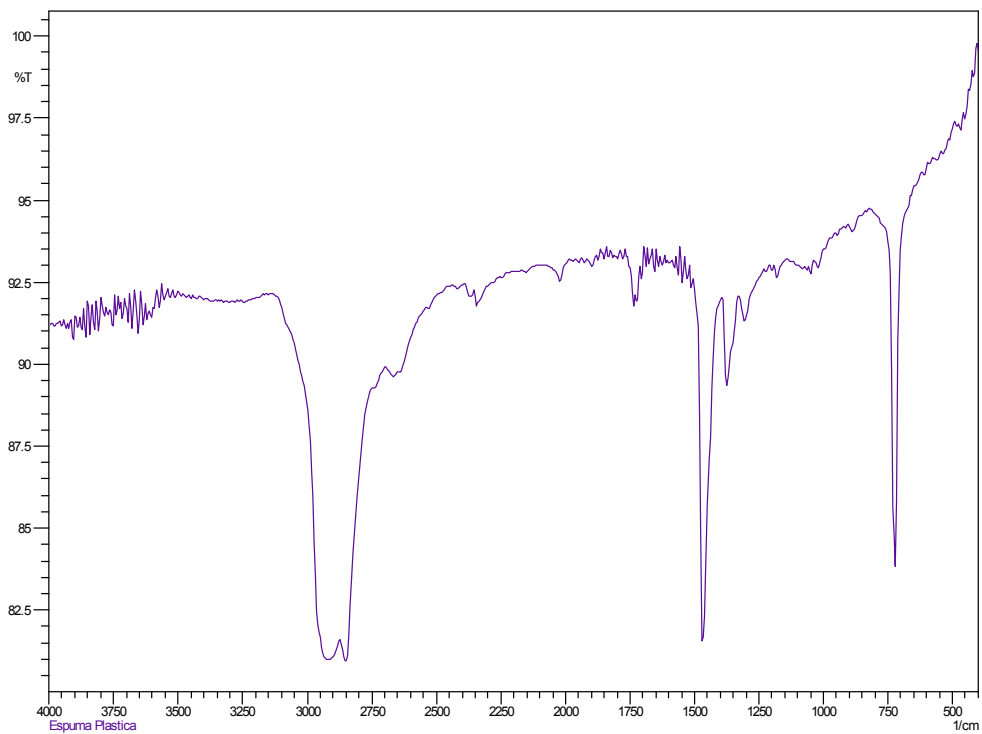
La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de  $c$  altos,  $\epsilon$  varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc [50].

## ANEXO D INFRARROJO DE UNO DE LOS MATERIALES EMPLEADOS

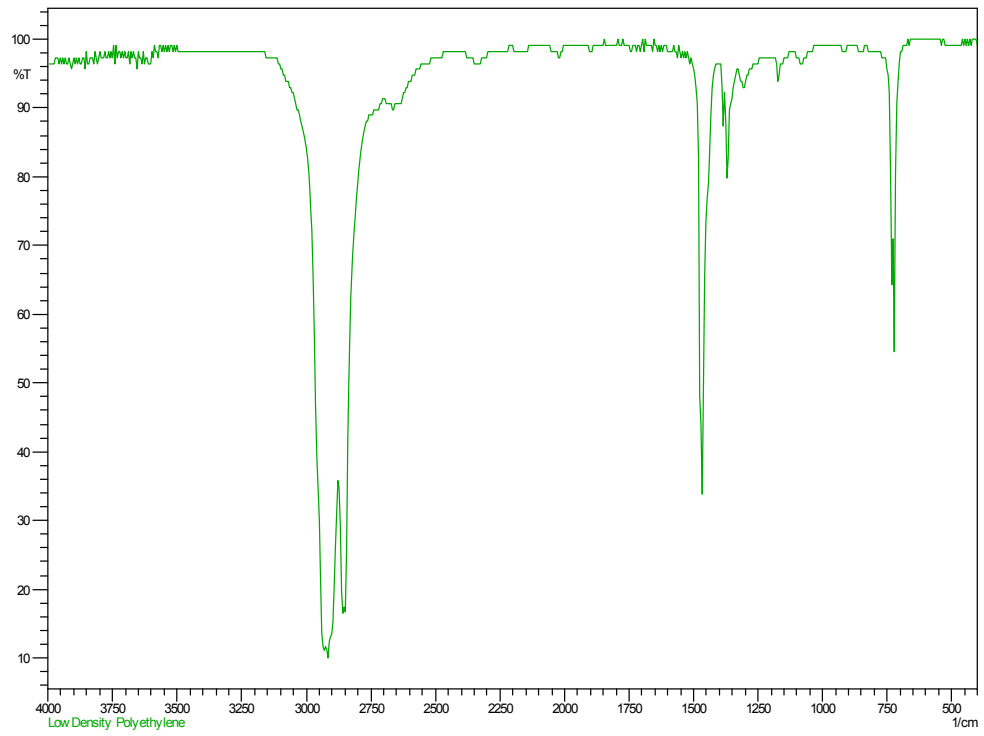
**Figura D1.** Traslapadas la espuma plástica y el polietileno de baja densidad



**Figura D2.** Infrarrojo de la espuma plástica



**Figura D3.** Infrarrojo del polietileno de baja densidad



## ANEXO E DATOS EXPERIMENTALES

**Tabla E1.** Variación de la absorbancia y la concentración a través del tiempo (células libres en el medio)

Días	Ln ( concentración)	Concentración (g/ml)	Absorbancia
0,5	1,562	4,767346939	0,596
1	1,548	4,702040816	0,588
1,5	1,565	4,783673469	0,598
2	1,467	4,334693878	0,543
2,5	1,641	5,159183673	0,644
3	1,905	6,718367347	0,835
3,5	1,993	7,33877551	0,911
4	2,138	8,481632653	1,051
4,5	2,135	8,457142857	1,048
5	2,409	11,11836735	1,374
5,5	2,387	10,88163265	1,345
6	2,589	13,31428571	1,643
6,5	2,573	13,11020408	1,618
7	2,644	14,07346939	1,736
7,5	2,644	14,06530612	1,735
8	2,733	15,37142857	1,895
8,5	2,831	16,96326531	2,090
9	2,788	16,25306122	2,003
9,5	2,843	17,1755102	2,116
10	2,919	18,52244898	2,281
10,5	2,878	17,77959184	2,190
11	2,960	19,28979592	2,375
11,5	2,988	19,84489796	2,443
12	2,988	19,84489796	2,443
12,5	3,131	22,88979592	2,816
13	3,069	21,51020408	2,647
13,5	3,094	22,07346939	2,716
14	3,118	22,60408163	2,781
14,5	3,009	20,26938776	2,495
15	3,142	23,15102041	2,848
15,5	3,150	23,33061224	2,870
16	3,170	23,8122449	2,929
16,5	3,207	24,71020408	3,039

<b>17</b>	3,189	24,26122449	2,984
<b>17,5</b>	3,235	25,40408163	3,124
<b>18</b>	3,196	24,4244898	3,004
<b>18,5</b>	3,249	25,76326531	3,168
<b>19</b>	3,236	25,43673469	3,128
<b>20</b>	3,290	26,84081633	3,300

**Tabla E2** Resultados de la loofha

<b>LOOFHA</b>							
<b>Tiempo</b>	<b>Reactores</b>	<b>MUESTRA</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>PESO SECO</b>
<b>DIA 5</b>	5 días	0,230	0,141	0,082	0,051	0,026	0,0090
<b>DIA 10</b>	5 días	0,101	0,044	0,017	0,001	0,000	0,0083
	10días	0,198	0,097	0,068	0,024	0,002	0,0056
<b>DIA 15</b>	5 días	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0037
	15días	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0135

**Tabla E3** Resultados del poliestireno

<b>Poliestireno</b>							
<b>Tiempo</b>	<b>Reactores</b>	<b>MUESTRA</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>PESO SECO</b>
<b>DIA 5</b>	5 días	0,275	0,151	0,120	0,089	0,066	0,000
<b>DIA 10</b>	5 días	1,265	0,683	0,357	0,182	0,080	0,000
	10días	2,059	1,191	0,646	0,327	0,177	0,000
<b>DIA 15</b>	5 días	1,990	1,147	0,612	0,327	0,171	0,000
	15días	2,152	1,240	0,715	0,399	0,227	0,000

**Tabla E4** Resultados del poliuretano rígido

<b>PESO SECO</b>				<b>(g)</b>		
<b>Tiempo</b>	Reactor	Espesor				
<b>DIA 5</b>	5 DIAS	1 cm	Original	0,0288		
			Copia	0,0278		
			2cm	Original	0,0260	
				Copia	0,0455	
			4cm	Original	0,0894	
				Copia	0,0872	
<b>DIA 10</b>	5 DIAS	1 cm	Original	0,0155		
			Copia	0,0157		
				2cm	Original	0,0301
					Copia	0,0330
				4cm	Original	0,0197
					Copia	0,0291
	10 DIAS		1 cm	Original	0,0336	
				Copia	0,0254	
				2cm	Original	0,0722
					Copia	0,0839
				4cm	Original	0,1192
					Copia	0,0640
<b>DIA 15</b>	5 DIAS	1 cm	Original	0,0200		
			Copia	0,0169		
				2cm	Original	0,0308
					Copia	0,0289
				4cm	Original	0,0466
					Copia	0,0422
	15 DIAS		1 cm	Original	0,0273	
				Copia	0,0244	
				2cm	Original	0,0674
					Copia	0,0289
				4cm	Original	0,0885
					Copia	0,1240

**Tabla E5** Resultados del poliuretano rígido condensado

<b>Cosecha de biomasa (g)</b>						
	Original			Copia		
<b>Reactores</b>	1cm	2cm	4cm	1cm	2cm	4cm
<b>5D</b>	0,0643	0,0869	0,1557	0,0604	0,1074	0,1585
<b>10D</b>	0,0336	0,0301	0,1192	0,0254	0,0839	0,0640
<b>15D</b>	0,0273	0,0674	0,0885	0,0244	0,0790	0,0790

**Tabla E6** Resultados del polietileno de baja densidad.

<b>PESO SECO</b>				<b>(g)</b>
<b>Tiempo</b>	Reactor	Espesor		
<b>DIA 5</b>	5 DIAS	1 cm	Original	0,0425
			Copia	0,0141
		2cm	Original	0,0341
			Copia	0,0282
		4cm	Original	0,0638
			Copia	0,0425
<b>DIA 10</b>	5 DIAS	1 cm	Original	0,0196
			Copia	0,0141
		2cm	Original	0,0189
			Copia	0,0210
		4cm	Original	0,0386
			Copia	0,0238
	10 DIAS	1 cm	Original	0,0144
			Copia	0,0243
		2cm	Original	0,0322
			Copia	0,0353
		4cm	Original	0,0607
			Copia	0,0313
<b>DIA 15</b>	5 DIAS	1 cm	Original	0,0156
			Copia	0,0097
		2cm	Original	0,0119
			Copia	0,0174
		4cm	Original	0,0269

			Copia	0,0210
	15 DIAS	1 cm	Original	0,0269
			Copia	0,0115
		2cm	Original	0,0236
			Copia	0,0264
		4cm	Original	0,0302
			Copia	0,0279

**Tabla E7** Resultados del polietileno de baja densidad condensados

<b>Cosecha de biomasa (g)</b>						
	Original			Copia		
<b>Reactores</b>	1cm	2cm	4cm	1cm	2cm	4cm
<b>5D</b>	0,0455	0,0649	0,1293	0,0379	0,0666	0,0873
<b>10D</b>	0,0384	0,0699	0,0909	0,0243	0,0353	0,0313
<b>15D</b>	0,0269	0,0236	0,0302	0,0115	0,0264	0,0279

## **ANEXO F BALANCE DE BIOMASA EN REACTOR DISCONTINUO**

Después de un corto período de adaptación al nuevo ambiente (fase lag) los microorganismos se comienzan a reproducir incrementando su número y su biomasa en forma exponencial. La existencia de alimento en cantidad suficiente proporciona las condiciones adecuadas para una tasa de crecimiento máxima.

Si X representa la concentración de biomasa, la producción celular en un reactor discontinuo se puede describir como:

Producción de X = acumulación de X

$$r_p - r_d = \frac{dx}{dt}$$

Donde:

$r_p = \mu x$  : Tasa de crecimiento de la población celular

$r_d = \alpha x$  : Tasa de desaparición de la población celular

$\frac{dx}{dt}$  : Acumulación de biomasa en el reactor

$\mu$  : Velocidad específica de crecimiento (máxima en la fase exponencial)

$\mu \gg \alpha$  : Condición de diseño

$$(\mu - \alpha)x = \frac{dx}{dt}$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

$$\ln x = \mu t + C$$

## ANEXO G CRECIMIENTO MICROBIANO

Según G. Richter [51] en termodinámica, el término equilibrio se emplea no sólo para denotar la ausencia de cambio, sino también la ausencia de cualquier tendencia hacia un cambio a escala macroscópica; el estado de equilibrio, no existe en una célula viva pues haría imposible cualquier obtención de energía y la capacidad para producir trabajo celular, por esta razón una célula o bien un organismo trata siempre de alcanzar un equilibrio pero nunca lo logra. En esta forma el sistema viviente está capacitado para obtener energía continuamente, aparentemente los componentes químicos están presentes en concentraciones estacionarias, pero en realidad no existe un equilibrio termodinámico si no un “equilibrio de flujo” caracterizado por entrar las sustancias primitivas con igual velocidad como dejan los productos el sistema. Intercalada está una serie de reacciones parciales, cada una de las cuales utilizan los productos de la anterior y produce de estos el substrato para la reacción siguiente, para la célula o el organismo, el equilibrio se alcanza cuando acaba el suministro de sustancias primitivas lo que significa el fin de la obtención de energía y con este la muerte.

En un cultivo discontinuo de microorganismos en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano Figura G1:

- Fase lag o de adaptación: Durante esta fase los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.
- Fase exponencial o logarítmica: En ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase los microorganismos consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.
- Fase estacionaria: En ella no se incrementa el número de microorganismos. Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el

crecimiento microbiano. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales.

- Fase de muerte: Se produce una reducción del número de microorganismos viables del cultivo.

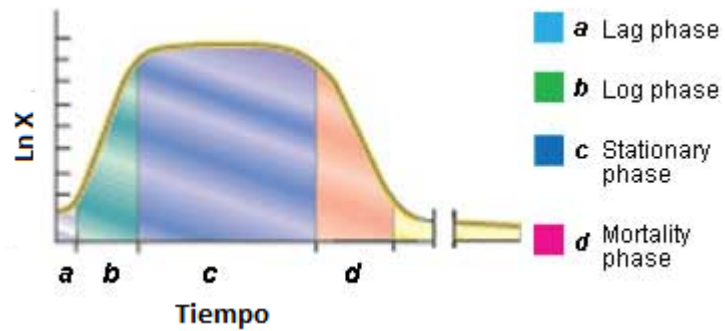


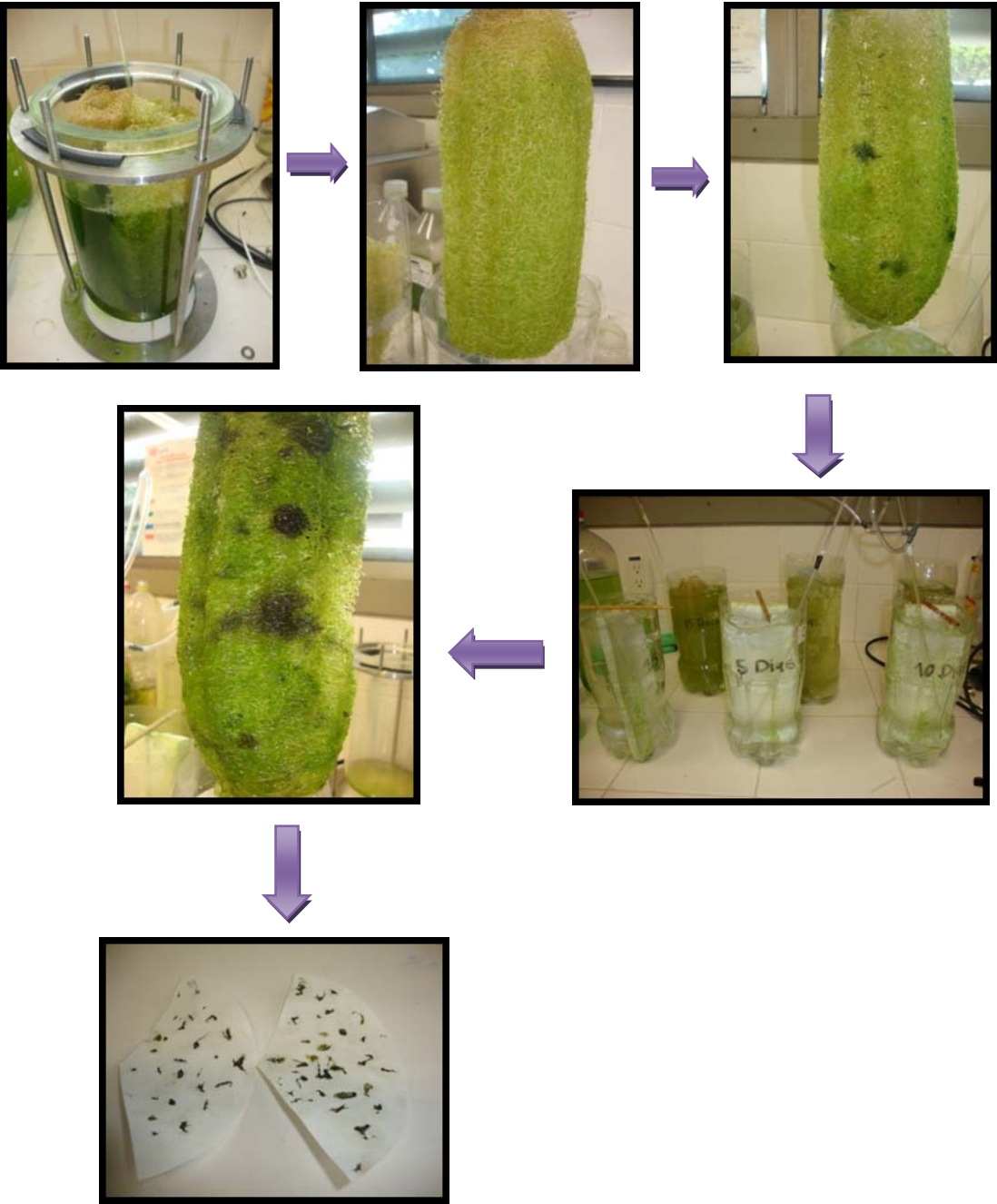
Figura G1: Fases de crecimiento microbiano

## ANEXO H PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

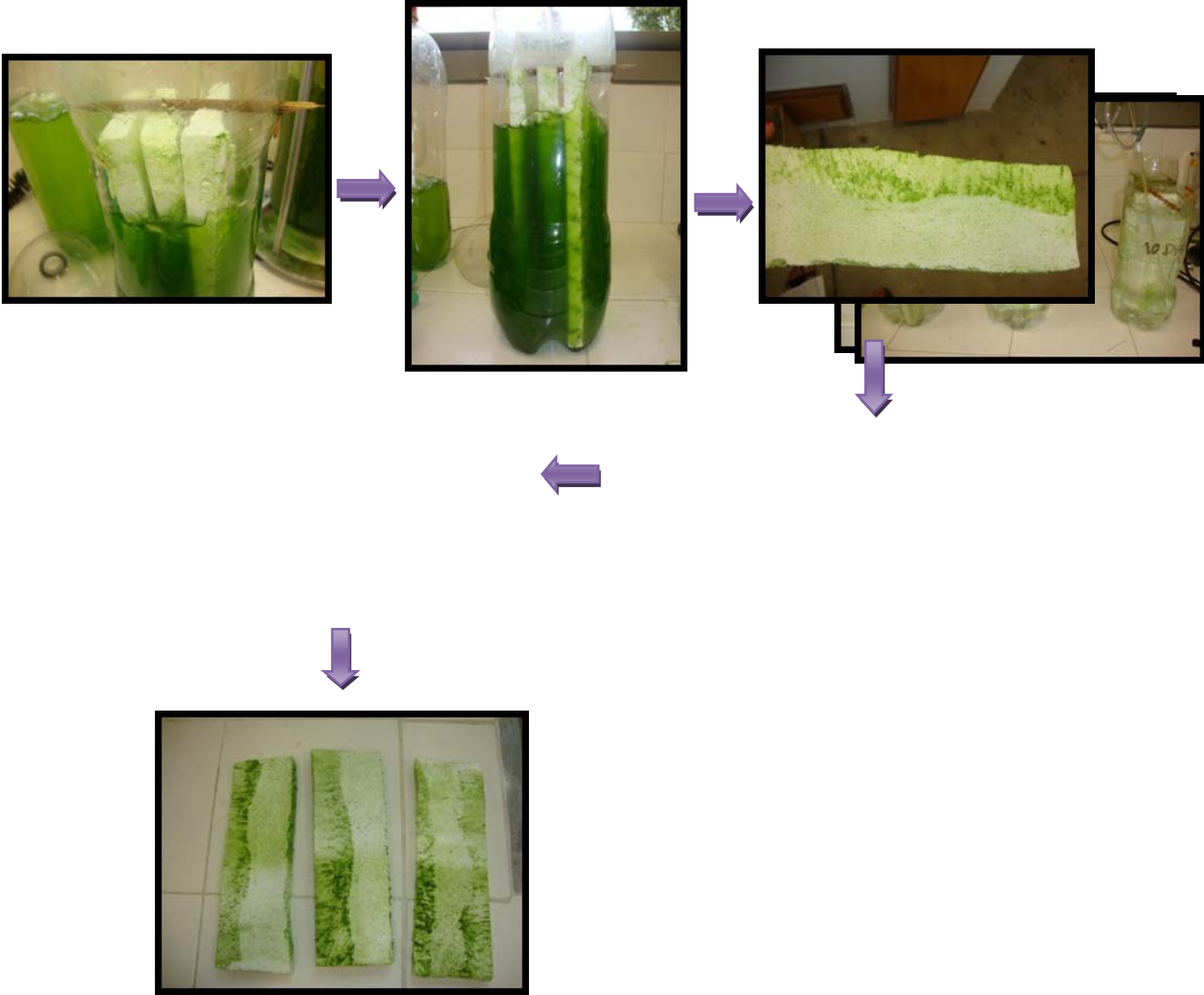
### H1. Procedimiento general



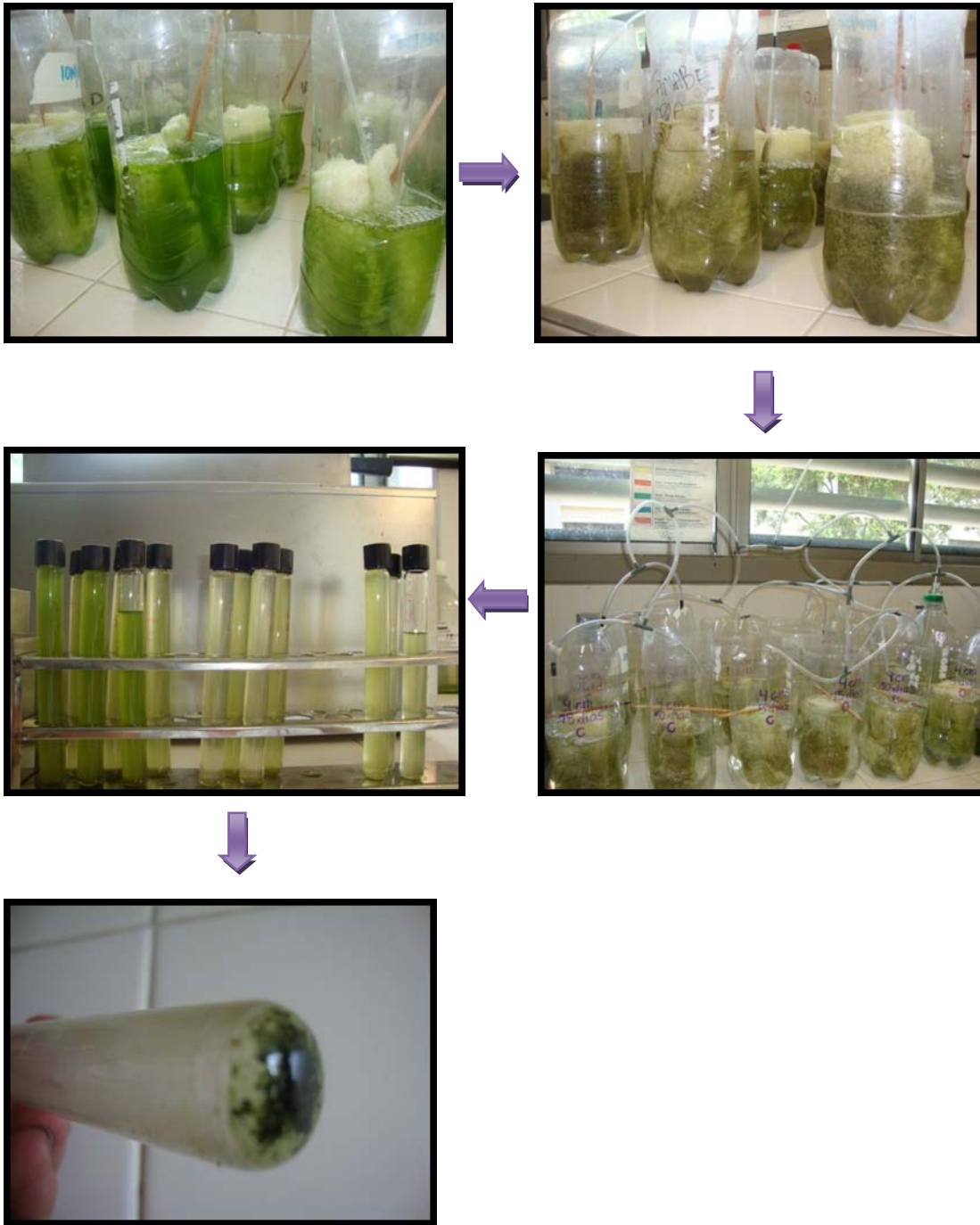
H2. Procedimiento para la esponja de Loofha



**H3. Procedimiento para el poliestireno**



**H4. Procedimiento para el poliuretano rígido**



**H5. Procedimiento para el polietileno de baja densidad**

