

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE SECUESTRO DE CO₂ DE *Chlorella vulgaris*
UTEX 1803 EN AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES EN
FOTOBIOREACTORES A ESCALA LABORATORIO.**

ANDRES FERNANDO CEPEDA BAUTISTA



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE SECUESTRO DE CO₂ DE *Chlorella vulgaris*
UTEX 1803 EN AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES EN
FOTOBIOREACTORES A ESCALA LABORATORIO.**

ANDRES FERNANDO CEPEDA BAUTISTA

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

Director

**Prof. Viatcheslav Kafarov
Ingeniero Químico Dr. Sc.**

Co-director

**Andrés Fernando Barajas Solano
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2011

Dedicatoria

A Dios, si no fuera por el no estaría acá;

A mis padres por el aguante con sus hijos

Gracias Isabel Bautista Gómez y Alfonso Cepeda Ortiz.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia y seres cercanos, en especial Adriana Serrano Santiago en sus múltiples correcciones, observaciones y por la confianza, apoyo en cada palabra que se plasmó en este escrito, en cada vivir y esfuerzo que conllevó el desarrollo de esta experiencia universitaria, y que siempre me impulsaron para lograr convertirme en un excelente profesional.

Agradezco a la Universidad Industrial de Santander la cual me ofreció acumular tanta riqueza intelectual y experiencia social.

Finalmente agradezco al doctor Kafarov por permitirme la realización del trabajo de grado en el centro de investigación de desarrollo y energía. También a mi co-director Andrés Fernando Barajas Solano por su ayuda, consejos y buena energía, por último a las explicaciones y apoyo de mi compañero Carlos Gerardo Valbuena.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	12
1. ALCANCE	14
2. FUNDAMENTO TEORICO	15
2.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	15
2.2 MEDIOS DE CULTIVO	16
2.3 AGUA RESIDUAL INDUSTRIAL DE LOS DESTILADOS DE ALCOHOLES (VINAZAS)	16
2.4 FUNDAMENTOS DE TRANSFERENCIA DE GASES	17
2.4.1 Concentración de la saturación de un Gas	17
2.4.2 Solubilidad de los gases	18
2.4.3 Dióxido de Carbono	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Microalgas y condiciones de Cultivo	20
3.2 Fotobiorreactor	20
3.3 Diseño Experimental	21
3.4 Análisis estadístico	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Análisis Estadísticos	28
CONCLUSIONES	32
RECOMENDACIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS	37

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Comparaciones múltiples entre tratamientos con suministro de CO_2 cada 15 minutos obtenidos con la prueba de kruskal-wallis; productividad biomasa ($\text{g l}^{-1} \text{ día}^{-1}$); $p=0,035$; $n=20$.	28
Tabla 2. Comparaciones múltiples entre tratamientos con suministro de CO_2 cada 60 minutos obtenidos con la prueba de kruskal-wallis; productividad biomasa ($\text{g l}^{-1} \text{ día}^{-1}$); $p=0,013$; $n=20$.	29
Tabla 3. Comparaciones múltiples entre tratamientos con suministro de CO_2 obtenidos con la prueba de kruskal-wallis; productividad biomasa ($\text{g l}^{-1} \text{ día}^{-1}$); $p = 0,029$; $n=30$.	30
Tabla 4. Se enseña las diferentes composiciones de las stock solutions, necesarias para preparar el medio de cultivo bold basal para un volumen de trabajo de 1 litro.	37
Tabla 5. Variación de la absorbancia con la concentración de la muestra.	38

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Intercambio gaseoso (a) sistema en equilibrio; (b) un sistema con una deficiencia en el gas disuelto.	18
Figura 2. Foto bioreactor escala laboratorio	21
Figura 3. Procedimiento a seguir para la medición de densidad celular en los fotobioreactores	22
Figura 4. Crecimiento de biomasa a diferentes concentraciones con suministro de CO_2 cada 15 minutos.	24
Figura 5. Crecimiento de biomasa a diferentes concentraciones con suministro de CO_2 cada 60 minutos	24
Figura 6. Productividad de biomasa a diferentes concentraciones de vinazas y suministro de CO_2	25
Figura 7. Productividad de clorofila en diferentes concentraciones de vinazas	26
Figura 8. Foto de muestras obtenidas a partir de bioreactores a concentraciones de 10%, 30%, 50% y 100% (vista microscópica).	27
Figura 9. Comparaciones entre tratamientos con respecto a la productividad de vinazas con suministro de CO_2 cada 15 minutos.	29
Figura 10. Comparaciones entre tratamientos con respecto a la productividad de vinazas con suministro de CO_2 cada 60 minutos.	29
Figura 11. Comparaciones entre tratamientos con respecto a la productividad de vinazas.	31

RESUMEN

Título: ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE SECUESTRO DE CO₂ DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES EN FOTOBIOREACTORES A ESCALA LABORATORIO.*.

Autor: ANDRES FERNANDO CEPEDA BAUTISTA..**

Palabras claves: Microalgas, Agua Residual Industrial, Suministro de CO₂.

La industrialización, la expansión de la agricultura y el incremento en el tamaño poblacional han aumentado la contaminación en fuentes hídricas, entre los principales contaminantes de estos cuerpos de aguas se encuentran los destilados de alcoholes, conocidos como vinazas, los cuales se caracterizan por tener un alto contenido de material orgánico e inorgánico. Se han planteado metodologías las cuales son costosas y poco viables; sin embargo, las microalgas surgen como una alternativa para abordar esta problemática.

Dado lo anterior, se evaluó la habilidad de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 para secuestrar CO₂ en Vinazas; para ello se cultivó el alga en diferentes concentraciones iniciales de vinazas (10%, 30%, 50%, 100%) a inyecciones de CO₂ 6% m/v cada 15 minutos y 18% m/v cada 60 minutos. La capacidad de secuestrar CO₂ en medios enriquecidos a 50% y 100% no fueron buenos; solo el medio enriquecido a 10% en ambos tratamientos presentó una mejor productividad de biomasa, siendo necesario la utilización de un tercer tratamiento en el cual se corroboró la poca capacidad de secuestrar CO₂ por parte de *C. vulgaris* en medios con vinazas. A pesar de que existieron diferencias significativas a diferentes concentraciones de vinazas (P<0.05), la capacidad de secuestrar CO₂ en medios con vinazas no favorece la productividad de biomasa de *C. vulgaris*.

Los autores agradecen al PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA CYTED, al proyecto "Nuevas tecnologías para la producción de biocombustibles" UNESCO 330303,332205,530603,330399, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y al Instituto Colombiano del Petróleo ICP-ECOPETROL

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director PhD. Viatchesla Kafarov, Biólogo Andrés Fernando Barajas Solano.

ABSTRACT

Title: **STUDY OF CO₂ SEQUESTRATION CAPACITY OF *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 IN INDUSTRIAL WASTEWATER LABORATORY SCALE PHOTOBIOREACTORS.*.**

Author: ANDRES BAUTISTA FERNANDO CEPEDA.**.

Keywords: Microalgae, Industrial Waste Water, CO₂ supply.

Industrialization, agricultural expansion and the increase in population size have increased pollution in water sources, the main contaminants of these water bodies are the distilled spirits, known as stillage, which are characterized by a high content of organic and inorganic material. Methodologies have been raised which are expensive and impractical, but the algae are emerging as an alternative to these problems.

Given this, we evaluated the ability of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 to sequester CO₂ in bagasse, vinasse, for the alga was grown at different initial concentrations of vinasse (10%, 30%, 50%, 100%) to 6% CO₂ injections m / v every 15 minutes and 18% m / v every 60 minutes. The ability to sequester CO₂ in rich media at 50% and 100% were not good, only 10% enriched medium in both treatments had the highest biomass productivity, necessitating the use of a third treatment in which little was corroborated ability to sequester CO₂ from *C. vulgaris* in media with vinasse. Although significant differences at different concentrations of vinasse ($P < 0.05$), the ability to sequester CO₂ in media with vinasse not favor biomass productivity of *C. vulgaris*.

The authors thank AMERICAN SCIENCE PROGRAM CYTED, the project "New technologies for biofuel production" 330303,332205,530603,330399 UNESCO, the Ministry of Agriculture and Rural Development and the Colombian Petroleum Institute ICP-ECOPETROL.

* Grade Project

** Physicochemical Faculty of Engineering. School of Chemical Engineering. Director PhD. Viatchesla Kafarov, biologist Andrés Fernando Barajas Solano.

INTRODUCCION

El desarrollo social sostenible requiere de formas ecológicamente aceptables para la obtención de energía, sin embargo, la industrialización, la expansión de la agricultura y el incremento en el tamaño poblacional han aumentado la contaminación en ríos, lagos y mares debido al inadecuado tratamiento de aguas residuales [1]. Muchos de estos residuos son productos de procesos industriales y aguas domesticas que poseen altas cargas de materia orgánica e inorgánica, los cuales son vertidos a fuentes hídricas cercanas provocando cambios físico-químicos que afectara la abundancia y actividad de los individuos que los constituyen [2]. Dada esta problemática y la necesidad de recuperar estas fuentes hídricas, muchos estudios han sido enfocados en remover el exceso de contaminantes mediante la aplicación de organismos aerobios y anaerobios [1, 2,3]; pero muchas de estas metodologías son costosas y poco eficientes [4].

Las microalgas son organismos que desempeñan un papel clave en los ecosistemas acuáticos. Se estima que alrededor del 40% de la fotosíntesis global es realizada por estos microorganismos, siendo los productores de más de la mitad del oxígeno a nivel mundial [5, 26]. En la actualidad son observadas con gran interés por ser una alternativa viable desde el punto de vista económico, ecológico, para la obtención de Biocombustibles [6] y el tratamiento de aguas residuales. Especialmente en países tropicales debido a los altos valores de radiación y altas temperaturas [7].

Las vinazas son residuos del proceso de los destilados, los cuales son extremadamente contaminantes debido a su gran contenido de material orgánico y minerales como potasio, fosforo, nitrógeno y compuestos sulfurados [17] los cuales le confieren un pH ácido (4-5) [8]. Según Travieso, un metro cubico de vinazas (1m^3) equivale a la contaminación generada por una población de 1000

habitantes [18] vertidos en fuentes de agua sin ningún tipo de tratamiento. En este trabajo se evalúa el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en bioreactores a nivel de laboratorio evaluando su capacidad de secuestrar CO₂ como fuente de carbono para su desarrollo en medios cultivo con vinazas.

1. ALCANCE

Evaluar el agua residual de los destilados de alcoholes, a concentraciones de 10%, 30% ,50% y 100% mezcladas con medio Bold Basal con lo cual se obtendrá el más conveniente para el uso de este, como medio de cultivo para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, que de tal forma se genere una alternativa como tratamiento de aguas residuales industriales.

Determinar la absorción del dióxido de carbono suministrando pulsos de este, con un caudal de 10 SCHF a dos diferentes intervalos de tiempo (88 segundos cada 15 minutos y 264 segundos cada 60 minutos), a bioreactores con medio de cultivo de aguas residuales industriales de los destilados de alcoholes.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 *Chlorella vulgaris*

Chlorella sp. hace parte de eukaria, en la división *Chlorophyta* o algas verdes [10], de la especie *vulgaris*. Es un alga unicelular, de agua dulce; de forma esférica, Reino protocista, División *Chlorophyta*, Clase *Chlorophyceae*, Orden: *Chlorococcales*, Familia: *Oocystaceae*, Género: *Chlorella*, Especie: *vulgaris* [19].

Comparada con otras microalgas, *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 (*C. vulgaris*) puede dividirse en cuatro células cada 20 horas. Además, posee una alta concentración de clorofila, esto le confiere una mayor capacidad fotosintética mayor que la de cianobacterias y plantas superiores, convirtiendo el agua y dióxido de carbono en biocompuestos [9].

El cultivo a gran escala de microalgas y el uso práctico de su biomasa como una fuente de energía (por instancia lípidos, alimento, entre otros) fue considerado por primera vez en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial [8]. Las investigaciones iniciales fueron realizadas por un grupo de científicos de Carnegie Instituto Washington, cuyo objetivo principal fue el uso de la *Chlorella* sp. como fuente de alimento a gran escala [9].

Las investigaciones realizadas en cultivos de microalgas son consideradas de gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y comercial [11]. En tal sentido, se han utilizado los cultivos discontinuos por su fácil manejo para determinar la cinética de crecimiento y los parámetros que influyen en su desarrollo poblacional [10]; sin embargo, el uso de los medios de cultivo sintéticos ha incrementado sustancialmente el valor económico para la producción de la biomasa de estos microorganismos [11].

2.2 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivos celulares son indispensables para sostener apropiadamente cepas de células u organismos [19]: En una buena producción de biomasa es importante elegir un medio que contenga todos los nutrientes básicos que se necesita para conseguir energía, y así sintetizar macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono y lípidos) [5]. Existen muchas clases de medios de cultivo, aun para un mismo tipo de células, o un mismo organismo, la imposición de este ambiente artificial genera un periodo de adaptación fisiológica o de selección, en el que el crecimiento de la población puede no ocurrir o es muy lento [19].

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las algas son: cantidad y calidad de nutrientes, luz, pH, turbulencia, salinidad y temperatura [12]. Así mismo existen tres (3) componentes que influyen en el desarrollo de la microalga: un recipiente adecuado, el medio en el cual las algas puedan crecer y aireación.

Las algas necesitan elementos nutritivos fundamentalmente de forma inorgánica para crecer. Debe tenerse en cuenta que no todas las algas tienen los mismos requerimientos nutritivos, y por ello estos deben ser tenidos en cuenta antes de iniciar el cultivo masivo de algún alga determinada.

2.3 AGUA RESIDUAL INDUSTRIAL DE LOS DESTILADOS DE ALCOHOLES (VINAZAS)

Las actuales perspectivas a nivel mundial de incrementar la producción de alcohol a partir de jugos y melazas para su empleo como combustible automotor [7],

probablemente aumentarán los índices de contaminación debido a la no aplicación de tecnologías que permitan la reducción de la carga contaminante [13].

Durante los procesos de destilación se generan corrientes de aguas residuales que consisten de vinazas, agua de refrigeración y aguas residuales de los procesos de la fermentación [16]. Estos residuos son extremadamente contaminante y contiene aproximadamente un 5% de material orgánico y minerales como el potasio, fosforo y nitrógeno. Para la realización de estos procesos se requiere de grandes volúmenes de agua, generando altos niveles de aguas residuales [17].

Las vinazas de destilería de alcohol se encuentran entre los residuos orgánicos de mayor efecto contaminante sobre la flora y la fauna del planeta. La problemática principal radica en que por cada hectolitro de alcohol producido a partir de miel final, se obtienen de manera adicional 15 hectolitros de vinaza como residual, con una demanda química de oxígeno (DQO₅) entre 60 y 70 g/L y un pH alrededor de 4 [13]. Muchos de estos subproductos obtenidos, son utilizados para producir CO₂ el cual puede ser suministrado en cultivos de microalgas en fotobioreactores [15]. Teniendo en cuenta que la selección de una cepa de microalga aceptable para la bio-mitigación del CO₂ tiene un efecto significativo en lo que respecta a costos y competitividad [7].

2.4 FUNDAMENTOS DE TRANSFERENCIA DE GASES

2.4.1 CONCENTRACIÓN DE LA SATURACIÓN DE UN GAS

Cuando un líquido es puesto en contacto con un gas, existen condiciones de intercambio continuo de moléculas desde la fase líquida a la fase gaseosa y viceversa (figura 1). Tan pronto como las concentraciones de solubilidad en la fase líquida es alcanzada, los flujos comienzan a tener una magnitud similar, de tal

manera que no generan cambios en la concentración del gas ni en las dos fases. El equilibrio dinámico es asociado con la concentración de saturación del gas en la fase líquida [2].

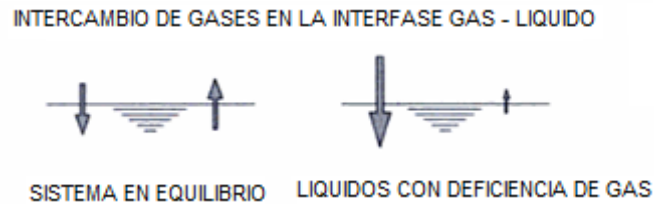


Figura 1. Intercambio gaseoso (a) sistema en equilibrio; (b) un sistema con una deficiencia en el gas disuelto.

Fuente: Sperling, M. y Chernicharo, C. (2005).

2.4.2 SOLUBILIDAD DE LOS GASES

Al colocar en contacto un cierta cantidad de un gas simple y un líquido relativamente no volátil, se logra un estado de equilibrio con respecto a sus concentraciones resultante del gas disuelto en el líquido, este estado depende de la naturaleza del gas el cual está expresado por el coeficiente de distribución K_D , la temperatura del agua, la impureza que contiene el agua y la velocidad de absorción la cual equivale a la velocidad del gas [20, 21].

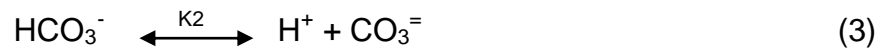
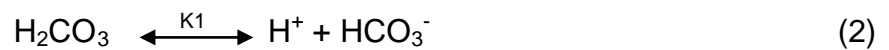
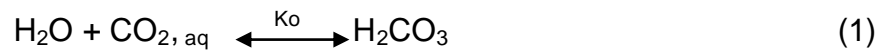
2.4.3 DIÓXIDO DE CARBONO

El consumo acelerado del petróleo es uno de los responsables de los cambios climáticos, disminuyendo la calidad del ambiente. Un ejemplo de ello, es el sistema de transporte en Estados Unidos el cual genera grandes cantidades de dióxido de carbono que contribuye a los efectos del calentamiento global. Se espera que el dióxido de carbono incremente de 1,9 billones toneladas métricas en el 2004 a 2,7 billones toneladas métricas en el 2030 [22].

La fijación biológica del CO_2 por las algas es considerada una alternativa plausible, que a su vez ayuda a prevenir el calentamiento global [15], ya que este, puede servir como fuente de carbón para las células fotosintéticas, pero debe

residir en la fase acuosa para su secuestro. El CO_2 es un gas que a condiciones ideales de temperatura y presión es de baja solubilidad en el agua. La disponibilidad del CO_2 en los cuerpos de agua se presentan en cuatro (4) diferentes formas químicas: (a) dióxido de carbono (CO_2); (b) ácido carbónico (H_2CO_3); (c) ion bicarbonato (HCO_3^-), y (d) ion carbonato ($\text{CO}_3^{=}$), cuyas concentraciones en el equilibrio dependen del pH [23].

Para su disolución en agua, el CO_2 sufre tres (3) reacciones químicas que involucran las cuatro (4) diferentes formas químicas como se presenta (1-3) [23].



Después de realizar el suministro de CO_2 a los respectivos cultivos de microalgas, los datos proporcionados son usados para construir curvas de crecimiento de la densidad de biomasa contra el tiempo del cual se obtienen las máximas tasas de crecimiento específico ($\mu_{\text{máx.}}$, d^{-1}) de la fase de crecimiento medio. La fase de crecimiento activo es entre 24 y 288 horas con $r^2 \geq 0,97$ (coeficiente de correlación). El tiempo medio de biomasa es calculado por $t_d = \ln 2 \cdot (\mu_{\text{máx.}})^{-1}$ [24, 25].

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2 MICROALGAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizó *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, perteneciente al 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 compuesto por NaNO_3 : 0,25 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,075 g; NaCl : 0,025 g; K_2HPO_4 : 0,075; KH_2PO_4 : 0,175 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,025 g; H_3BO_3 : 0,01142 g; KOH 0,031 g y 1 ml de Solución de metales.

Se implementó un medio de cultivo Bold Basal siguiendo las especificaciones indicadas en el anexo (tabla 4.), luego de la preparación con las soluciones stock posteriormente se procedió a aforar a un litro con agua destilada. El medio fue inoculado con unas ciertas cantidades de cepa *C. vulgaris* hasta alcanzar una densidad celular de $0,8 \approx 0,4$ g/L.

3.3 FOTOBIOREACTOR

Se utilizaron fotobiorreactores tubulares para llevar a cabo el cultivo, botellas pet (Polietileno Tereftalato) transparentes de 2½ litros con diámetro interno de 12 cm, encontradas en el mercado, en los cuales se manejo un volumen de trabajo de 1 litro (Figura 2). La distribución de los biorreactores en el laboratorio fue de tal forma que se logro facilitar el suministro de CO_2 y lograr una distribución equitativa de luz durante todo el ciclo del día. Con respecto a la aireación se acopló a un sistema de burbujeo constante.



Figura 2. Foto bioreactor escala laboratorio

Fuente: El autor

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron dos (2) diferentes tratamientos evaluando la absorción del dióxido de carbono, suministrando pulsos de este con un caudal de 10 SCHF a dos diferentes intervalos de tiempo (88 segundos cada 15 minutos y 264 segundos cada 60 minutos) [27], a demás, fueron expuestos a varias concentraciones de vinazas (10%, 30%, 50%, 100%). Para evitar problemas de carencia e independencia de los datos se realizó un diseño con múltiples observaciones en cada uno de las concentraciones de vinazas utilizadas, consistiendo de una original y dos replicas.

Durante un periodo de cinco (5) días fueron tomadas de cada uno de los bioreactores dos (2) muestras de 6 ml cada 12 horas (mañana y tarde), correspondientes a los dos tratamientos. Las muestras fueron recolectadas antes del inicio del suministro de CO₂ y después de 15 minutos de la última inyección de CO₂, cada una de estas se centrifugaron a 3400 rpm, durante siete (7) minutos. Una vez culminada la centrifugación se procedió a retirar el sobrenadante del tubo teniendo precaución de no remover el pellet. Las muestras se aforaron hasta obtener un volumen de 6 ml utilizando agua destilada para posteriormente realizar

diluciones. De cada muestra se retiró un volumen de 3 ml el cual fue agregado a otro tubo de ensayo con 3 ml de agua destilada, se homogenizó el contenido del tubo para nuevamente retirar de este, un volumen de 3 ml, repitiendo este paso hasta obtener la cuarta (4) dilución que contendrá un volumen final de 6 ml (Figura 3).

Se realizó la medición de absorbancia con un espectrofotómetro (Spectroquant Phara 300 Merck). (Anexo 2) Según la ley de Beer-Lambert:

$$Abs = K * X * L \quad (4)$$

Donde, *Abs* es la absorbancia, *K* es el Coeficiente másico de extinción, *X* la concentración y *L* el espesor de la cubeta.



Figura 3. Procedimiento a seguir para la medición de densidad celular en los fotobiorreactores

Fuente: El autor

La primera y última dilución se mezcló en un mismo tubo de ensayo obteniendo un volumen final de 9 ml. Este paso fue realizado para cada una de las muestras con un total de nueve (9) por montaje. Posterior a esto, se realizó una nueva centrifugación a 3400 rpm, durante siete (7) minutos. Al finalizar, nuevamente se

retiró el sobrenadante. Se adicionaron 3 ml de etanol a cada una de las muestras y fueron colocadas en baño maría durante cinco (5) minutos. Culminado el tiempo, las muestras se dejaron enfriar con agua a temperatura ambiente y finalmente se les adiciono 2 ml más de etanol hasta obtener un volumen final de cinco (5) ml.

La formula (5) fue utilizada para medir la Clorofila Total sintetizada por *C. vulgaris*, a longitudes de onda de 665 nm y 650 nm en un espectrofotómetro (Spectroquant Phara 300 Merck) [3,8]:

$$\text{Clorofila total (mg*L)} = 25.8 * A_{650} + 4.0 * A_{665} \quad (5)$$

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para verificar la productividad de biomasa por el secuestre de CO₂ entre los dos tratamientos y a diferentes concentraciones de vinazas, se realizó una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, utilizando el software STATISTICA 7 [28]. Debido a que los datos no se ajustaron a los supuestos sobre normalidad e igualdad de varianzas (p<0,05) [14].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

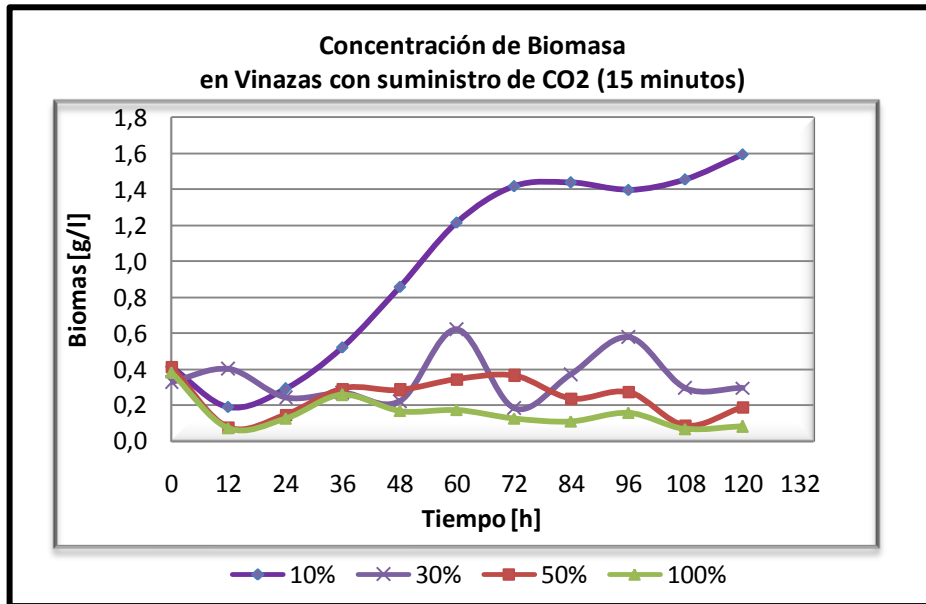


Figura 4. Crecimiento de biomasa a diferentes concentraciones con suministro de CO₂ cada 15 minutos.
Fuente: El autor

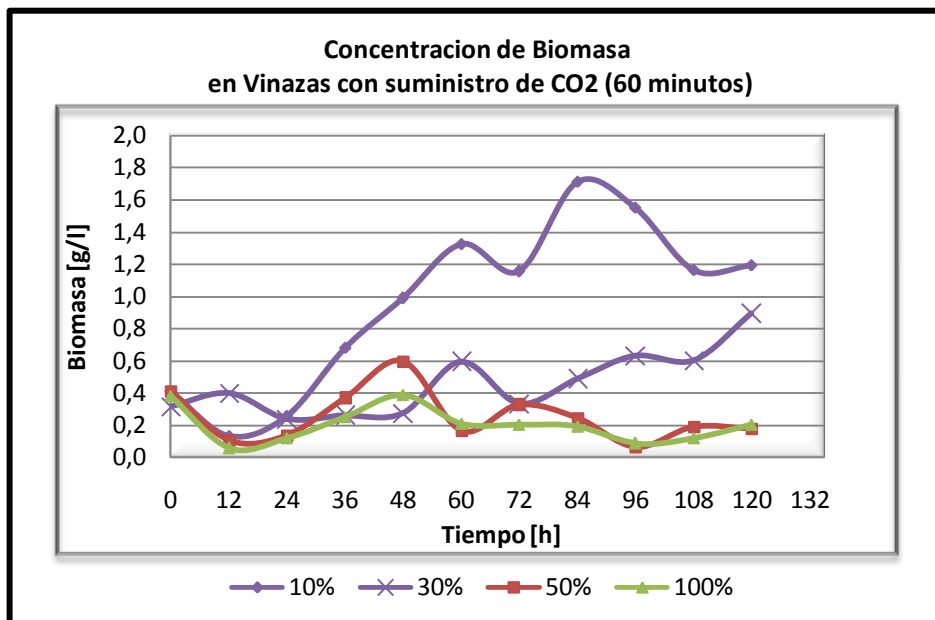


Figura 5. Crecimiento de biomasa a diferentes concentraciones con suministro de CO₂ cada 60 minutos.
Fuente: El autor

En la Figura 4 y 5 se muestra el crecimiento celular en las diferentes concentraciones de vinazas y dióxido de carbono a los dos intervalos de tiempo, donde el mejor crecimiento ocurre bajo una concentración del 10% de vinazas y disminuyendo su tasa de crecimiento a medida que aumenta la concentración de vinazas en el medio

En la Figura 6 se comparan las productividades después de cinco días de cultivo a partir de las diferentes concentraciones de vinazas y suministro de CO₂.

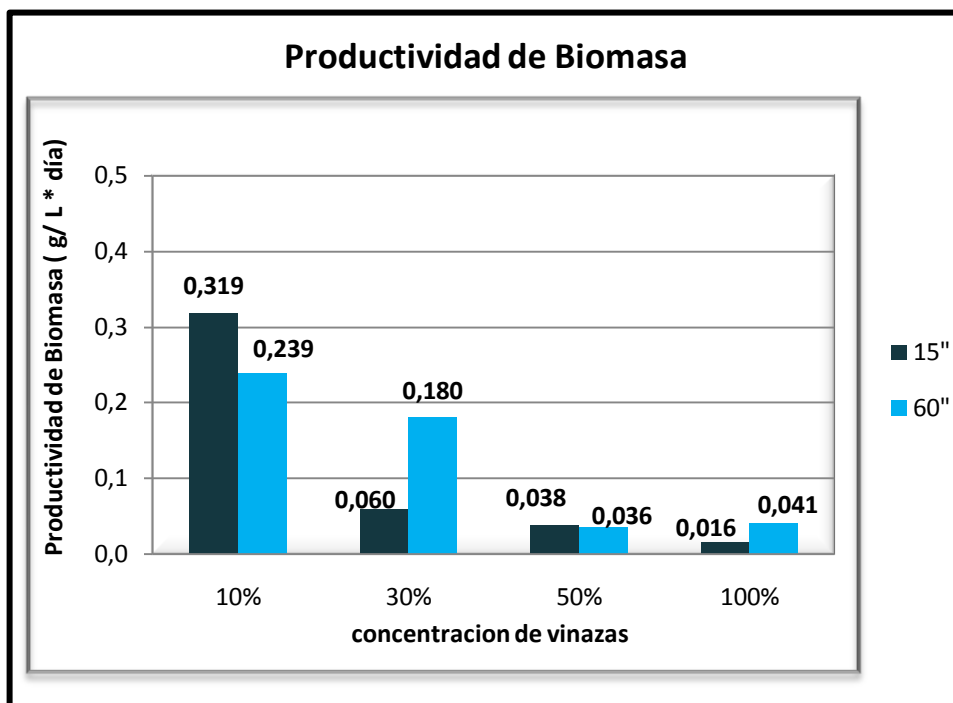


Figura 6. Productividad de biomasa a diferentes concentraciones de vinazas y suministro de CO₂
Fuente: El autor

Se observó que las mayores productividades de biomasa se alcanzaron en los tratamientos con concentraciones de vinazas menores al 30%, donde la máxima se logró en el tratamiento de 10% con un valor de 0,319 g L⁻¹ día⁻¹ para el suministro de dióxido de carbono cada 15 minutos y 0,239 g L⁻¹ día⁻¹ para cada 60 minutos. Cabe recordar que las diferentes muestras se encuentran mezcladas con

un medio estándar de cultivo en el cual, *C. vulgaris* crece de forma normal; a medida que disminuye dicha cantidad se obtuvo una baja productividad de biomasa, logrando un menor valor en el tratamiento de 100% con $0,016 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para el suministro de dióxido de carbono cada 15 minutos y $0,041 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para cada 60 minutos.

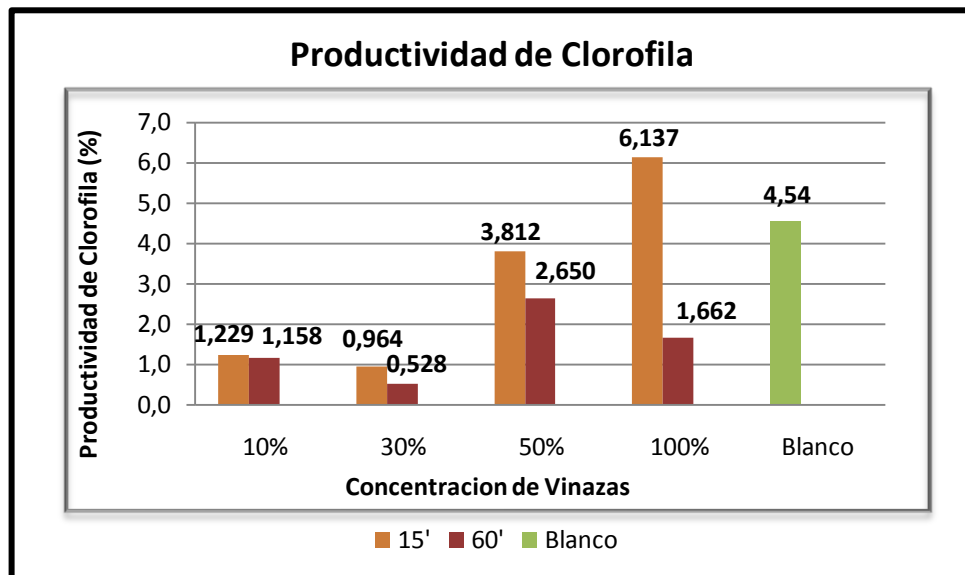


Figura 7. Productividad de clorofila en diferentes concentraciones de vinazas

Fuente: El autor

En la figura 7, se observa un incremento de la productividad de clorofila en mayores cantidades de vinazas, esto es debido a la influencia ocasionada por la cianobacteria presente en el medio, en cual ocurre un estado de simbiosis, afectando la productividad de biomasa como consecuencia de la competencia presentada entre el alga y la cianobacteria por el nitrógeno presente en el medio (figura 8).

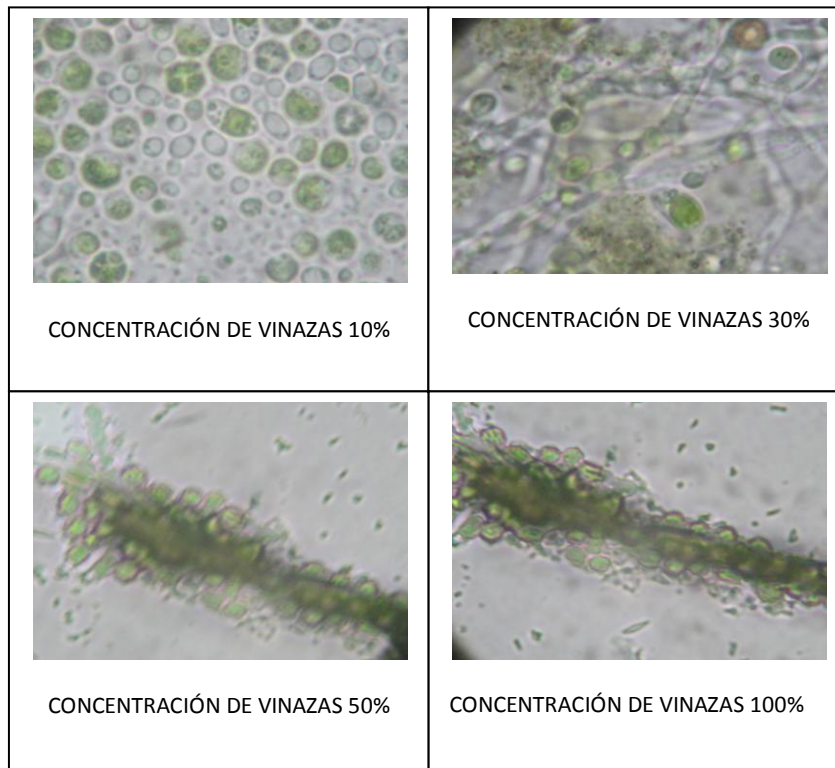


Figura 8.foto de muestras obtenías a partir de bioreactores a concentraciones de 10%, 30%, 50% y 100%(vista microscópica).

Fuente: El autor

Debido a que las cianobacterias tienen un metabolismo más simple y posee mayor capacidad de asimilar nitrógeno más rápidamente que *C. vulgaris*, el secuestre de CO₂ en estos tratamientos fueron bajos tal y como fue observado en la productividad de biomasa [29].

Así mismos las cianobacterias también poseen Clorofila a, lo cual genero interferencia ya que se le realizó a los tratamientos de 50% y 100% los procesos de obtención y medición de Clorofila Total, se midieron clorofilas provenientes de *C. vulgaris* así como de la cianobacteria.

4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos en el laboratorio se tabularon para luego ser analizados e interpretados en forma estadística, y poder corroborar lo explicado anteriormente, teniendo como variable de respuesta la productividad de biomasa. Se evaluaron todos los tratamientos, agrupándose los datos por días concretamente en las horas de la tarde durante un periodo de 5 días de cultivo.

El tratamiento de CO₂ a intervalos de tiempo de 15 minutos y a distintas concentraciones de vinazas, mostraron diferencias significativas en la productividad de biomasa (P=0,035); observándose una desigualdad entre los tratamientos a 10% con respecto a los de 50% y 100%. Hay que resaltar, que el tratamientos de 10% en comparación con el de 30%, mostro una leve similitud (p= 0,079). Como podemos observar los valores de color rojo muestran la diferencia presente entre los tratamientos. Tabla 1.

TABLA 1. Comparaciones múltiples entre tratamientos con suministro de co₂ cada 15 minutos obtenidos con la prueba de kruskal-wallis; productividad biomasa (g l-1 día-1); p=0,035; n=20.

	10%;15'	30%;15'	50%; 15'	100%; 15'
10%;15'		0,079617	0,043115	0,043115
30%;15'	0,079617		0,079617	0,043115
50%; 15'	0,043115	0,079617		0,043115
100%; 15'	0,043115	0,043115	0,043115	

Fuente: El autor

El tratamiento de CO₂ a intervalos de tiempo de 60 minutos y distintas concentraciones de vinazas, mostraron diferencias significativas en la productividad de biomasa (P=0,138); observándose diferencias entre los tratamientos a 10% con respecto a los otros tres tratamientos (P< 0,05) Tabla 2.

TABLA 2. Comparaciones múltiples entre tratamientos con suministro de CO₂ cada 60 minutos obtenidos con la prueba de kruskal-wallis; productividad biomasa (g l⁻¹ día⁻¹); p=0,0138; n=20.

	10%;60'	30%; 60'	50%; 60'	100%; 60'
10%;60'		0,026499	0,002498	0,001310
30%; 60'	0,026499		0,641885	0,439533
50%; 60'	0,002498	0,641885		0,985015
100%; 60'	0,001310	0,439533	0,985015	

Fuente: El autor

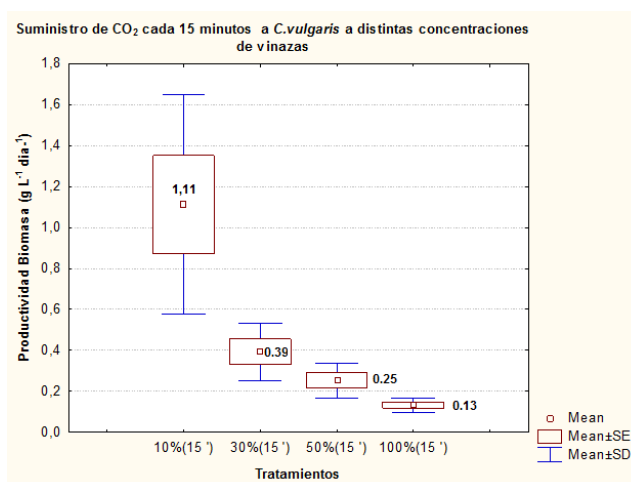


Figura 9. Comparaciones entre tratamientos con respecto a la productividad de vinazas con suministro de CO₂ cada 15 minutos.

Fuente: El autor

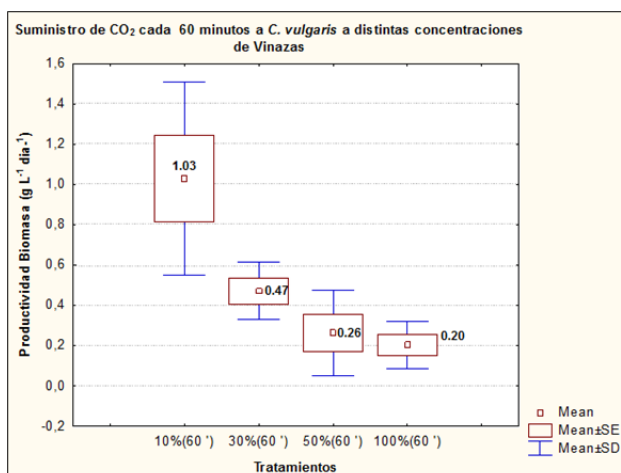


Figura 10. Comparaciones entre tratamientos con respecto a la productividad de vinazas con suministro de CO₂ cada 60 minutos.

Fuente: El autor

La mayor productividad de biomasa fue observada en el tratamiento de 10% de vinazas (Figura 9 y 10). Cabe resaltar que la productividad de la biomasa fue menor en el tratamiento de 60 minutos en comparación con los valores obtenidos en el tratamiento con suministro de CO₂ a intervalos de 15 minutos.

Debido a que las diferencias presentadas entre los tratamiento de 15 y 60 minutos con suministro de CO₂ con respecto a la productividad de biomasa a concentraciones de vinazas al 10% y 30% no mostraron diferencias muy notorias en sus valores promedio, se decidió realizar un tercer ensayo en el cual se pretendía corroborar si existían o no diferencias significativas entre estas. La prueba de Kruskal-Wallis arrojó un p=0,0297 mostrando diferencias significativas entre los tratamientos como se observa en la Tabla 3.

Este resultado permite afirmar que no existe un secuestro efectivo por parte de *C. vulgaris* utilizando diferentes concentraciones de vinazas (figura 11); cabe aclarar que las vinazas no son funcionales como medio de crecimiento adecuado para esta cepa con el objetivo de obtener un crecimiento notorio.

TABLA 3. Comparaciones múltiples entre tratamientos con suministro de co₂ obtenidos con la prueba de kruskal-wallis; productividad biomasa (g l-1 dia-1); p = 0,029; n=30.

	10%;15'	30%;15'	10%;60'	30%;60'	10%; B	30% B
10%;15'		0,0796	0,5000	0,0796	0,8927	0,0796
30%;15'	0,0796		0,0796	0,4653	0,0431	0,8927
10%;60'	0,5000	0,0796		0,0796	0,5001	0,0796
30%;60'	0,0796	0,4653	0,0796		0,0431	0,1380
10%; B	0,8927	0,0431	0,5001	0,0431		0,0431
30% B	0,0796	0,8927	0,0796	0,1380	0,0431	

Fuente: los autores

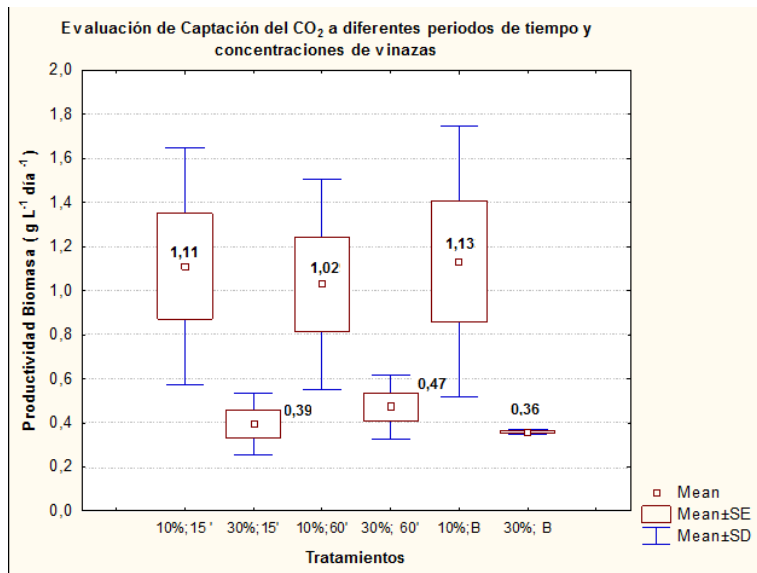


Figura 11. Comparaciones entre tratamientos con respecto a la productividad de vinazas.

Fuente: los autores

CONCLUSIONES

La utilización de vinazas obtenidas de los destilados a distintas concentraciones como medio de cultivo para el crecimiento de *Chlorella vulgaris* no es muy favorable. Porque evita la captación de CO₂ inyectado como fuente de carbono obteniéndose bajos valores de productividad de biomasa.

Así mismo las vinazas obtenidas de los destilados poseen gran contenido de nitrógeno. A pesar de ello, el crecimiento de la microalga no fue favorable, debido a que el nitrógeno presente no se encuentra de la forma necesaria para ser capturado por la microalga y de esta forma realizar sus requerimientos metabólicos.

Las cianobacterias son capaces de asimilar cualquier tipo de fuente de nitrógeno inorgánico permitiendo la realización de simbiosis entre *Chlorella vulgaris* y la cianobacteria, de esta forma sobrevivir en el medio, esto se observó en los tratamientos en los cuales fueron utilizadas concentraciones mayores a 30% de vinazas.

A pesar de utilizar distintos tiempos en la inyección de CO₂ el secuestro de este no fue significativo en la productividad de biomasa por parte de *Chlorella vulgaris*, comprobándose que el aumento en las inyecciones de CO₂ no estimuló la productividad de biomasa, cuando es utilizada las vinazas como medio de cultivo.

RECOMENDACIONES

Estudiar la incidencia de las aguas residuales industriales de los evaporados de alcoholes como medio de cultivo para *Chlorella vulgaris*, que de tal forma se genere una alternativa para el tratamiento de estas vinazas.

Analizar el efecto de suministrar CO₂ como fuente de carbono para cultivos, compuestos de medio Bold Basal y aguas residuales industriales de los evaporados de alcoholes con intensidad de logro una productividad de biomasa significativa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aslan, S. y Kapdan, I. K. (2006). Batch Kinetics of Nitrogen and Phosphorus Removal from Synthetic Wastewater by Algae. ELSEVIER. *Ecological Engineering*. Vol. 28. Pp. 64-70.
2. Bernal, C. B., Vázquez, G., Quintal, I. B. y Bussy, A. L. (2008). Microalga Dynamics in Batch Reactors for Municipal Wastewater Treatment Containing Dairy Sewage Water. *Water Air Soil Pollut.* Vol. 190. Pp. 259-270.
3. An, J. Y., Sim, J. S., Lee, S. J. y Kim, B. W. (2003). Hydrocarbon Production from Secondarily Treated Piggery Wastewater by the Green Alga *Botryococcus braunii*. *Journal of Applied Psychology*. Vol. 15. Pp. 185-191.
4. Marín, A. R., Mendoza, L. G. y Stephenson, T. (2010). Growth and Nutrients Removal in Free and Immobilized Green Algae in Batch and Semi-continuous Cultures Treating Real Wastewater. ELSEVIER. *Bioresource Technology*. Vol. 1, Pp. 58-64.
5. Edberg, A. (2010). Growth of *Chlorella vulgaris* at High Carbon Dioxide Levels in Swedish Light Conditions.
6. Brennan, L. y Owende, P. (2010). Biofuels from Microalgae – A Review of Technologies for Production, Processing, and Extraction of Biofuels and Co-products. ELSEVIER. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 14 Pp. 557-577.
7. Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., León, M., Raposo, F. y Rincón, B. 2008. Performance of a Laboratory-scale Microalgae Pond for Secondary Treatment of Distillery Wastewaters. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. Vol. 22. Pp. 467-473.
8. E. W. Becker, *et al.*, (1995). *Microalgae biotechnology and microbiology*. Cambridge, Great Britain.

9. Kanno, T. y Kazie, U. (2005). *Chlorella vulgaris*: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. Publicado por Woodland Publishing. 63 páginas.
10. Abalde J., A. Cid, J. P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero. (1995). *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. Universidad Da Coruña.
11. González B., E. Buitargo y K. Frontado. (1999). Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura.
12. Barsanti, L. G. (2006). General Overview. In *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*.
13. Lezcano, P. y Mora, L. M. (2005). las vinazas de destilería de alcohol. contaminación ambiental o tratamiento para evitarlo.
14. González, C. G., Felpeto, A. B., Estraviz, I. M., Alarcón, I. R., Castaño, A. R. y Liste, A. V. (2006). Tratamiento de datos. Capítulo VII, Pp. 127-147.
15. Doušková I., Kaštánek F., Maléterová Y., Kaštánek P., Doucha J., Zachleder V. (2010). Utilization of distillery stillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogas-cogeneration-microalgae-products, ELSEVIER, Energy Conversion and Management. Vol. 51 Pp. 606–611.
16. Duarte, E., Martins, M., Carvalho, E., Costa, S. y Spranger, I., (1997). An integrated approach for overcoming the environmental impacts of wineries wastewaters a Portuguese case study. In: Proceedings of International Symposium of the Vine and wine, 07–10 October, 1997. Yangling, China, pp. 1–5.
17. Borrero, M.A.V., Pereira, J.T.V. y Miranda, E.E., (2003). An environmental management method for sugar cane alcohol production in Brazil. *Biomass Bioenergy*. 25, 287–299.
18. Travieso, L. Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., León, M., Raposo, F. y Rincón, B. (2008). Assesment of a Microalgae Pond for Post-Treatment of

- the Effluent from an Anaerobic Fixed Bed Reactor Treating Distillery Wastewater. *Environmental Technology*. Vol. 29 Pp. 985-992.
19. Watanabe, M.M.(2005). Capitulo 2, Freshwater cultura Media. *Algal Culturing Techniques*, Pp.13-20.
 20. Sperling, M. y Chernicharo, C. *Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions Vol. 1, Capitulo 11*, Pp. 458-460.
 21. Popel, J. (1979). *Aeration and gas transfer*. 2. Ed
 22. Demain, A. L. (2009). Biosolutions to the energy problem. *Journal of industrial microbiology and Biotechnology*. Vol. 36(3). Pp 319-332.
 23. Hill, G. A. (2006). Measurement of Overall Volumetric Mass Transfer Coefficients for Carbon Dioxide in a Well-Mixed Reactor Using a pH Probe. *Ind. Eng. Chem*. Vol. 45(16), 5796-5800.
 24. Bailey, JE. y Ollis, DF. (1986) *Biochemical engineering fundamentals*, 2nd ed. McGraw-Hill, Singapore.
 25. Barajas, A. (2009) *Bioprospeccion de microalgas colombianas para la producción de Biodiesel*. Agronet. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
 26. Garrido, I. M. (2008). *Microalgae immobilization: Current techniques and uses*. Elsevier. *Bioresource Technology*. Vol.99 Pp. 3949–396.
 27. Villalón, A. J. y Gómez, A. F. (2010). *Estudio de la incidencia del suministro de CO₂ en el crecimiento de las microalgas en un fotobioreactor escala laboratorio.* (estudio de la incidencia del suministro de co2 en el crecimiento de las microalgas en un fotobioreactor escala laboratorio- universidad industrial de Santander), Libro.
 28. *Statistica versión 7*. Statsoft company information [en línea]. Working with Projects: Dynamically, Interactively Select and Query Data Directly from Graphs [ref. 2004]. Disponible en Web: <http://www.statsoft.com/> >.
 29. ChnNASamy, S., Bhatnagar, A. y Hunt, R.W. (2010). *Microalgae Cultivation, in a Wastewater Dominated by Carpet Mill Effluents for Biofuel Applications*.

ANEXOS

ANEXO 1. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO.

TABLA 4. SE ENSEÑA LAS DIFERENTES COMPOSICIONES DE LAS STOCK SOLUTIONS, NECESARIAS PARA PREPARAR EL MEDIO DE CULTIVO BOLD BASAL PARA UN VOLUMEN DE TRABAJO DE 1 LITRO.

Soluciones Stock	Para 400 ml
(1). NaNO ₃	10.0 g
(2). MgSO ₄ .7H ₂ O	3.0 g
(3). NaCl	1.0 g
(4). K ₂ HPO ₄	3.0 g
(5). KH ₂ PO ₄	7.0 g
(6). CaCl ₂ .2H ₂ O	1.0 g

Soluciones Stock	Para un Litro
(7). Solución de elementos de traza (autoclave para disolverse): ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.82 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.44 g
MoO ₃	0.71 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.57 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.49 g
(8). H ₃ BO ₃	11.42 g
(9). EDTA	50.0 g
KOH	31.0 g
(10). FeSO ₄ .7H ₂ O	4.98 g
H ₂ SO ₄ (concentrado)	1.0 ml

Medio	Para un Litro
Soluciones <i>Stock</i> 1 - 6	10 ml cada una
Soluciones <i>Stock</i> 7 - 10	1 ml cada una

ANEXO 2. CALCULO DEL COEFICIENTE MÁSCICO DE EXTINCIÓN

TABLA 5. VARIACIÓN DE LA ABSORBANCIA CON LA CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA.

Peso seco por vol. de muestra (concentración g/L)	Absorbancia
0	0
1	0,807
0,5	0,434
0,25	0,233
0,125	0,117

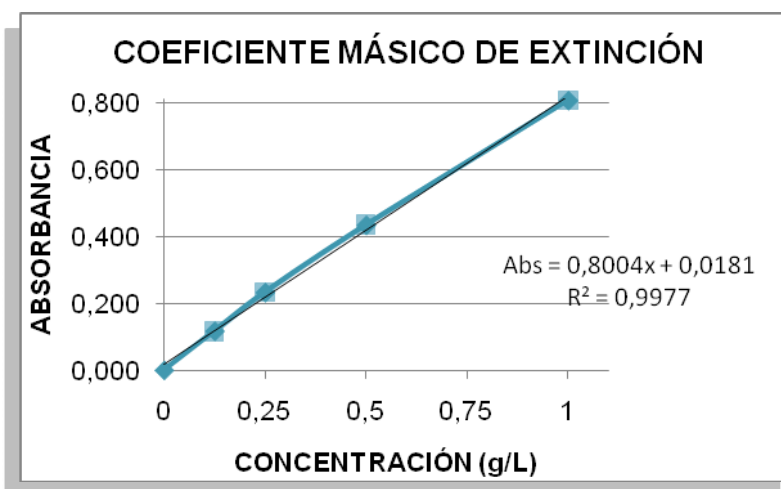


FIGURA1 . DATOS DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN, PARA EL CÁLCULO DEL COEFICIENTE MÁSCICO DE EXTINCIÓN.