

**ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DEL SUMINISTRO DE CO₂ EN EL
CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS EN UN FOTOBIOREACTOR A ESCALA
LABORATORIO.**

ANA MILENA GOMEZ FUENTES

NESTOR ANDRES JAIMES VILLARREAL

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

2010

**ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DEL SUMINISTRO DE CO₂ EN EL
CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS EN UN FOTOBIOREACTOR A ESCALA
LABORATORIO.**

ANA MILENA GOMEZ FUENTES

NESTOR ANDRES JAIMES VILLARREAL

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

Ingeniero Químico

Director

Prof. Viatcheslav Kafarov

Ingeniero Químico Dr. Sc.

Co-director

Biólogo. Andrés Fernando Barajas

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

2010

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se lo dedicamos a nuestras familias y amigos, que siempre han estado presentes apoyándonos y animándonos en esta experiencia universitaria, y que siempre nos han dado buenos consejos para convertirnos en excelentes profesionales.

Le queremos agradecer al Ministerio de Agricultura y desarrollo rural por el apoyo económico en el proyecto Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel código 2008D32006-6710, al Instituto Colombiano del Petróleo por el aporte intelectual.

También agradecer a la Universidad Industrial de Santander por ofrecernos tanta riqueza intelectual y experiencias sociales.

Finalmente agradecer al doctor Kafarov por ofrecernos la oportunidad de trabajar en un proyecto tan innovador y enriquecedor como este. También a Andrés Fernando Barajas por su ayuda, consejos y buena energía.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCION

1. CONCEPTOS TEORICOS.....	3
1.1. Microorganismos.....	3
1.1.1. Crecimiento microbiano.....	3
1.1.2. <i>Chlorella vulgaris</i>	4
1.2. Medio de cultivo.....	5
1.3. Sistemas de cultivo.....	5
1.3.1. Sistemas cerrados.....	5
1.4. Parámetros en el cultivo.....	6
1.4.1. pH.....	6
1.4.2. Intercambio de gases.....	7
1.5. Dióxido de carbono CO ₂	8
1.5.1. Solubilidad de los gases.....	8
1.5.2. Disolución del CO ₂	10
1.5.3. Parámetros cinéticos y fijación de CO ₂	11
2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	12

2.1 Cultivo microalgas (Inoculo).....	12
2.2 Fotobiorreactor.....	12
2.3 Medio de cultivo.....	13
2.4 Control de pH.....	13
2.5 Inyección de CO ₂	14
2.6 Medición de concentración celular.....	14
2.7 Tratamiento de datos.....	15
3. RESULTADOS Y ANALISIS.....	16
3.1 Tiempos de inyección.....	16
3.2 Curvas de pH.....	16
3.3 Curvas de variación de la concentración X.....	17
3.4 Parámetros cinéticos y fijación de CO ₂	25
4. CONCLUSIONES.....	27
5. RECOMENDACIONES.....	28
6. BIBLIOGRAFIA.....	29
7. ANEXOS.....	32

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Imagen de <i>Chlorella vulgaris</i>	4
Figura 2. Curva de crecimiento microbiano.....	4
Figura 3. Diagrama del proceso.....	12
Figura 4. Fotobiorreactores a escala laboratorio.....	13
Figura 5. Curva control de pH.....	17
Figura 6. Curva de concentración 6% m/v a 15 minutos.....	18
Figura 7. Curva de concentración 12% m/v a 15 minutos.....	18
Figura 8. Curva de concentración 18% m/v a 15 minutos.....	19
Figura 9. Curva de concentración 6% m/v a 30 minutos.....	20
Figura 10. Curva de concentración 12% m/v a 30 minutos.....	21
Figura 11. Curva de concentración 18% m/v a 30 minutos.....	21
Figura 12. Curva de concentración 6% m/v a 60 minutos.....	22
Figura 13. Curva de concentración 12 % m/v a 60 minutos.....	23
Figura 14. Curva de concentración 18% m/v a 60 minutos.....	23
Figura 15. Grafica Productividad en cada reactor.....	25
Figura 16. Curva de calibración X vs Abs. Para muestra original.....	40

Figura 17. Curva de calibración X vs Abs. Para muestra copia.....40

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición medio Bold Basal.....	33
Tabla 2. Concentraciones y absorbancias curvas de calibración.....	39
Tabla 3. Concentraciones y absorbancias Reactor 1.....	41
Tabla 4. Concentraciones y absorbancias Reactor 2.....	42
Tabla 5. Concentraciones y absorbancias Reactor 3.....	42
Tabla 6. Concentraciones y absorbancias Reactor 4.....	43
Tabla 7. Concentraciones y absorbancias Reactor 5.....	43
Tabla 8. Concentraciones y absorbancias Reactor 6.....	44
Tabla 9. Concentraciones y absorbancias Reactor 7.....	44
Tabla 10. Concentraciones y absorbancias Reactor 8.....	45
Tabla 11. Concentraciones y absorbancias Reactor 9.....	45
Tabla 12. Tasas de crecimiento específico y productividades.....	46
Tabla 13. Fijación de CO ₂	46

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO.....	33
ANEXO 2. MEDICION DE LA CONCENTRACION DE CEPAS SEGUN LA LEY DE BEER-LAMBERT.....	34
ANEXO 3. DETERMINACION DE TIEMPOS DE INYECCION.....	36
ANEXO 4. DETERMINACION CURVA DE CALIBRACION Y LAS CONCENTRACIONES EN CADA REACTOR.....	38

RESUMEN

Título: ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DEL SUMINISTRO DE CO₂ EN EL CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS A ESCALA DE LABORATORIO*.

Autores: NESTOR ANDRES JAIMES VILLARREAL, ANA MILENA GOMEZ FUENTES**.

Palabras claves: Microalgas, suministro de CO₂, pH del cultivo

En el presente trabajo se analizó la influencia del suministro de CO₂ en el crecimiento de un cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris*, se utilizaron 9 reactores de 2 litros, con aireación constante, a los que solo se les controló el suministro de CO₂; esto se realizó inyectando a diferentes intervalos de tiempo 15, 30 y 60 minutos y a concentraciones de 6% m/v, 12% m/v y 18% m/v.

Se realizaron inyecciones a altas concentraciones de CO₂ para observar las caídas del pH en el cultivo. Se encontró que aunque hay una caída significativa este alcanza un equilibrio y no influye en el crecimiento del cultivo. Al cabo de realizar inyecciones durante 5 días se halló que lo óptimo para obtener una alta concentración celular y una alta productividad es realizar inyecciones a bajas concentraciones y cortos intervalos de tiempo (6% m/v cada 15 minutos), o inyectar altas concentraciones pero a intervalos de tiempo mayores (18% m/v cada 60 minutos).

Este proyecto hace parte de un proyecto global apoyado por el Ministerio de agricultura y Desarrollo rural, El Instituto Colombiano del Petróleo ICP el cual busca desarrollar un proceso de producción de biodiesel a escala laboratorio mediante la bioprospección, cultivo y evaluación del potencial de producción de microalgas nativas colombianas.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química.

Director PhD. Viatchesla Kafarov, Biólogo Andrés Fernando Barajas Solano.

ABSTRACT

TITTLE: STUDY OF THE IMPACT OF SUPPLY OF CO₂ ON THE GROWTH OF MICROALGAE AT LABORATORY SCALE*.

AUTHORS: NESTOR ANDRES JAIMES VILLARREAL, ANA MILENA GOMEZ FUENTES**.

KEY WORDS: Microalgae, supply of CO₂, pH of the culture.

In this paper we analyze the influence of CO₂ supply on growth of cultured microalgae *Chlorella vulgaris*, 9 reactors of 2 liters were used with constant aeration, to which only was controlled the supply of CO₂, that was performed by injecting different time intervals of 15.30 and 60 minutes and at concentrations of 6% m/v, 12% m/v and 18% m/v.

Injections were performed at high CO₂ concentrations to observe the fall of pH in the crop. We found that although there is a significant drop, this reaches equilibrium and it does not affect crop growth. After performing injections for 5 days it was found that the optimum for obtaining high cell concentration and high productivity is to make shots in low concentrations and short time intervals (6% m/v every 15 minutes), or injecting high concentrations but longer time intervals (18% m/v every 60 minutes).

This project is part of a major project supported by the Ministry of Agriculture and Rural Development (*Ministerio de agricultura y desarrollo rural*), the National Petroleum Institute (*Instituto Colombiano de Petroleo – ICP*) which seeks to develop a biodiesel production process at laboratory scale through bioprospecting, culture and evaluation of production potential of native microalgae in Colombia

*Thesis Project

** Faculty of Physical Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director Ph. D. Viatchesla Kafarov, Biologist Andrés Fernando Barajas Solano

INTRODUCCION

Los niveles de CO₂ en la atmosfera han aumentado alrededor del 25% desde la revolución industrial (Hanagata et al. 1992). Debido al agotamiento de las reservas de petróleo y a las consecuencias ambientales del uso excesivo de los combustibles fósiles; la producción de combustibles alternativos recibe gran atención (Ma y Hanna 1999; Chisti 2007; Song et al. 2008; Meng et al. 2008; Kalia & Purohit 2008). De entre los reemplazos a los combustibles fósiles, el Biodiesel es uno de los más importantes (Ma y Hanna 1999), ya que puede ser producido a partir de aceites vegetales, grasa de cocina reciclada, aceites de desecho, grasa animal y de lípidos provenientes de Microalgas (Van Gerpen 2005; Song et al. 2008).

La meta global es desarrollar procesos que tengan como objetivo reducir las emisiones de CO₂. La fijación biológica de CO₂ en microorganismos es un posible mecanismo y las microalgas cumplen los requerimientos para esta fijación. Es factible que las algas toleren grandes concentraciones de CO₂ y altas temperaturas y sean la solución mas indicada para reducir estas emisiones de CO₂ (Hanagata et al 1992).

Uno de los aspectos más relevantes a la hora de diseñar el fotobiorreactor y que afectan fuertemente el crecimiento de las microalgas es la transferencia del CO₂ de la fase de gas a la fase acuosa, ya que las células solo consumen el CO₂ en su forma disuelta (Hill 2006).

Este trabajo; con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, el Instituto Colombiano del Petróleo y el Centro de Investigaciones para el Desarrollo sostenible en Industria y Energía, en el marco del proyecto Bioprospeccion de microalgas colombianas para la producción de biodiesel código 2008D32006-

6710, pretende realizar un estudio sobre la influencia de la inyección de CO₂ a diferentes concentraciones en el crecimiento de un cultivo de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor a escala laboratorio. Se realizaron varias pruebas para determinar que concentración de CO₂ es la óptima en la producción de biomasa, teniendo en cuenta tiempos de inyección, dilución de CO₂ en el medio y la variaciones del pH.

1. CONCEPTOS TEORICOS.

1.1 Microorganismos

Las algas unicelulares representan un porcentaje muy notable del fitoplancton de los océanos y aguas dulces, que es donde se lleva a cabo no menos del 50% del total de la fotosíntesis que se realiza en nuestro planeta.

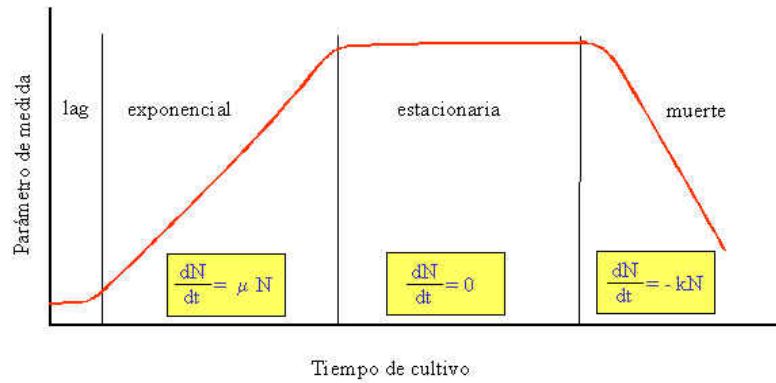
Las Microalgas son organismos unicelulares que pueden ser cultivadas muy rápidamente (Chisti 2008), a diferencia de las plantas poseen una estructura unicelular sin tallos, hojas o raíces lo cual permite que la extracción de los productos sea más fácil (Avagyan 2008). La obtención de biomasa es el principal objetivo, ya que esta es la forma más común de energía renovable, y posee un gran potencial para resolver problemas como el agotamiento de los recursos no renovables (Miao y Wu 2004; Li et al. 2008).

1.1.1 Crecimiento Microbiano

Para su crecimiento las Microalgas necesitan dos cosas, una es la fuente de carbono (normalmente en forma de CO₂), y una fuente de energía, en este caso la luz, pero no cualquier luz, sino aquella conocida como la radiación fotosintéticamente activa (o PAR de sus siglas en ingles) (Lee 1999, Csogor et al. 2001).

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 (Becker 1994); Fase Lag o de adaptación; Fase exponencial o logarítmica; Fase estacionaria y Fase de muerte.

Figura 1. Curva de crecimiento microbiano



1.1.2 *Chlorella vulgaris*

Se trabajó con la microalga *Chlorella* sp. Por que presenta altos contenidos de aceites. Comparada con otras microalgas, tiene una alta concentración de clorofila, así que su capacidad de fotosíntesis es mayor que la de otras plantas. *Chlorella vulgaris* puede dividirse en cuatro células cada 20 horas (Song, D. Fu, J. Shi, D. 2008).

Figura 2. Imagen *Chlorella vulgaris*



Taxonomía de *Chlorella vulgaris*: Reino: Protoctista; División: Chlorophyta; Clase Chlorophyceae; Orden: Chlorococcales; Familia: Oocystaceae; Género: *Chlorella*; Especie: *vulgaris*

1.2 Medio de Cultivo

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.

El medio esta compuesto generalmente por 3 componentes; macronutrientes, micronutrientes y vitaminas; todos los tres se preparan a menudo como las soluciones stock.

1.3 Sistemas de Cultivo

Existen dos diseños básicos para la producción de microorganismos fotoautotróficos, los sistemas abiertos en los que el cultivo esta expuesto a la atmosfera y los sistemas cerrados, comúnmente denominados fotobiorreactores, en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmosfera.

1.3.1 Sistemas Cerrados. Los fotobiorreactores permiten establecer cultivos de alta densidad, lo cual genera ventajas como facilidad para cosechar la biomasa, mantenimiento del cultivo sin contaminación, mejor control de condiciones de cultivo y menor inversión de capital en el fotobiorreactor.

El crecimiento de microorganismos fotosintéticos esta directamente relacionado a la proporción de fijación de CO₂, la intensidad de iluminación; en el laboratorio la elección del medio de cultivo y del fotobioreactor es crítica. **El fotobioreactor tubular vertical (VTP)** incrementa el área de contacto entre luz y fototrofos y el

tiempo de contacto entre luz y la fase gas/líquido, por consiguiente se incrementa la eficiencia de asimilación de CO₂. (Stewart and Hessami 2005).

Bajo estos criterios podemos separar los fotobiorreactores en dos tipos: airlift y columnas de burbujeo (Borowitzka 1999, Borja et al. 2001, Degen et al. 2001).

Estos dos tipos de reactores son los más usados, aunque el airlift presenta serios inconvenientes en el escalado, es la opción preferida para usar a nivel de laboratorio, ya que estudios como el de (Oncel y Suka 2008, Barbosa et al. 2003b) evidencian que son mejores, ya que permiten un mejor mezclado, permitiéndole a las células pasar por varios ciclos de luz/oscuridad.

1.4 Parámetros en el Cultivo

Luz, temperatura, pH y CO₂ son los principales parámetros para medir y controlar el crecimiento del cultivo de las microalgas.

A continuación se presentan los conceptos teóricos más relevantes para el manejo de los parámetros manejados durante la inyección de CO₂, que fueron pH e intercambio de gases.

1.4.1 pH

El pH del medio de cultivo determina la solubilidad del CO₂ y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono (CO, H₂CO₃, HCO₃⁻, CO₃⁼), e influyen directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas (Abalde et al., 1995).

El CO₂ puede ser utilizado para controlar el pH del cultivo (Lee and Pirt 1984, Delente et al. 1992, Babcock et al. 2002). Añadiendo CO₂ se acidifica el medio de cultivo y el consumo de nitratos por las algas causa alcalinización del medio. Un sistema puede fácilmente mantenerse estable usando un controlador de pH, el cual activa un solenoide para admitir el CO₂ en respuesta de la alcalinización del medio (Sonnleitner et al. 1999). En la práctica este sistema funciona bien siempre

y cuando exista una captación continua de nitrato. Si la alcalinización para, entonces no habrá mas adición de CO₂ y el cultivo puede volverse rápidamente limitado de CO₂.

1.4.2 Intercambio de Gases

Los fotobiorreactores pueden ser burbujeados con aire, pero la baja concentración de CO₂ en el aire (0,033% v/v) limitara a menudo el crecimiento fototrópico. Con un flujo de aire de 1L/min, y asumiendo que todo el CO₂ es usado y que la biomasa es 50% carbono, hay suficiente carbono para alimentar 3,54 x 10⁻⁴ gramos de biomasa/min, lo cual es una muy baja productividad. La solución mas simple es mezclar CO₂ con aire, por ejemplo, 0,2 a 5,0% del total del flujo de gas (Lee and Pirt 1984, Merchuk et al. 2000, Morita et al. 2001, Babcock et al. 2002) pero hay que tener cuidado para asegurar que el CO₂ inyectado no baje adversamente el pH del cultivo. También, con un sistema abierto, gran parte del CO₂ se escapara del envase sin ser usado.

Tan importante como es proporcionar CO₂, es igual de importante remover el O₂. Exceso de O₂ lleva a daños por fotoxidación e incrementa la tasa de fotorespiración, dos situaciones que son perjudiciales para la productividad. Existen dos buenos métodos para remover el exceso de O₂;

1. Remover el exceso de O₂ con una purga periódica de Nitrógeno gaseoso. Esto proporciona un uso más eficiente del CO₂ y reduce los niveles de O₂ a los del aire del ambiente.
2. El uso de un sistema químico para remover el oxígeno. El O₂ en exceso se hace reaccionar con hidrogeno gaseoso para formar agua usando un catalizador para purificar el H₂ que es comercialmente disponible.

1.5 DIOXIDO DE CARBONO CO₂

1.5.1 Solubilidad de los Gases

La solubilidad de los gases en el agua dependen de:

- La naturaleza de los gases, el que está expresado por el coeficiente de distribución K_D .
- La concentración del gas en la fase gaseosa (g/m^3) el mismo que está relacionado con la presión parcial P del gas en la fase gaseosa.
- La temperatura del agua T .
- Las impurezas que contiene el agua

- *Influencia de la concentración del gas*

Si el agua se expone a un gas o a una mezcla de gases existe un intercambio continuo de las moléculas del gas de la fase líquida en la fase gaseosa y viceversa. Tan pronto como la concentración de solubilidad en la fase líquida es alcanzada, ambas corrientes del gas serán de igual magnitud tal que no ocurrirá cambios de las concentraciones del gas en ambas fases (Aeration and Gas Transfer. Prof. Dr. Ing. H.J. Pöpel, 1995).

Este equilibrio dinámico se refiere generalmente como la solubilidad o la concentración de la saturación del gas en el líquido c_s (g/m^3). Cuanta más alta es la concentración del gas en la fase gaseosa es mayor la concentración de saturación en la fase líquida. Por lo que la relación entre el c_s de la concentración de la saturación y la concentración del gas en la fase de gas c_g (g/m^3) es dada por (Aeration and Gas Transfer. Prof. Dr. Ing. H.J. Pöpel, 1995):

$$c_s = k_D \cdot c_g$$

- *Influencia de la temperatura.*

Cuando los gases son disueltos en el agua, este proceso es generalmente acompañado por la liberación de calor. De acuerdo al principio de Le Chatelier, incrementos en la temperatura resultan en reducción de la solubilidad. La ecuación que se puede aplicar para generalizar la dependencia de la temperatura es (Aeration and Gas Transfer. Prof. Dr. Ing. H.J. Pöpel, 1995.):

$$\frac{d(\ln[kD])}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

Donde: R = constante universal de los gases

T = Temperatura absoluta (°K)

ΔH = Cambio del contenido de energía acompañando la absorción de 1 mol de gas (J/mol) (entalpía).

El valor de ΔH varía con la temperatura y la concentración.

- *Influencia de las impurezas en el agua.*

El coeficiente de distribución es válido solo para el agua pura. Debido a que el agua contiene otros constituyentes, estos influyen en la solubilidad de los gases y pueden ser expresados por el coeficiente de actividad (γ).

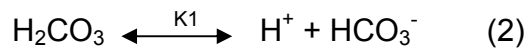
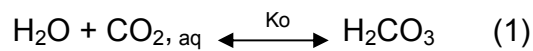
$$c_s = (k_D / \gamma) c_g$$

Para agua pura $\gamma = 1$, cuando γ se incrementa las concentraciones de sustancias disueltas en el agua son altas lo que disminuye la solubilidad, esta influencia de Concentraciones de impurezas sobre el coeficiente de actividad está representada por formulas empíricas (Metcalf and Eddy. Wastewater Engineering. McGraw Hill, New York, 1991).

1.5.2 Disolución del CO₂

El CO₂ puede servir como fuente de carbón para los cultivos de células fotosintéticas, pero debe residir en la fase acuosa para la captación. El CO₂ es un gas a temperatura y presión ambiente, y su solubilidad en agua es muy baja. Reside en la fase acuosa como 4 especies diferentes; dióxido de carbono (CO₂), ácido carbónico (H₂CO₃), ion bicarbonato (HCO₃⁻), y ion carbonato (CO₃⁼), cuyas concentraciones en el equilibrio dependen del pH.

Para su disolución en agua, el CO₂ sufre tres reacciones químicas que involucran cuatro especies químicas (dióxido de carbono CO₂, ácido carbónico H₂CO₃, bicarbonato ion HCO₃⁻, y carbonato ion CO₃⁼) según (Hill et al. 2001):



En las reacciones anteriores, las constantes de equilibrio (K₀, K₁, K₂) son funciones conocidas de la temperatura y de las concentraciones de las especies químicas. El valor de K₀ es tal que la concentración de CO₂ disuelto excede por mucho la de H₂CO₃ a cualquier condición. Aunque debido a que las conversiones de las reacciones 2 y 3 son mucho más rápidas que las de la reacción 1, el CO₂ disuelto y el H₂CO₃ en especies neutras son considerados como un solo componente y llamado ácido carbónico, H₂CO₃.

1.5.3 Parámetros Cinéticos y Fijación de CO₂

Los valores de biomasa que se calculan después de realizar las inyecciones de CO₂ durante los respectivos cultivos de microalgas 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 $t_d = \ln 2. (\mu_{\text{máx.}})^{-1}$ (Bailey and Ollis 1986).

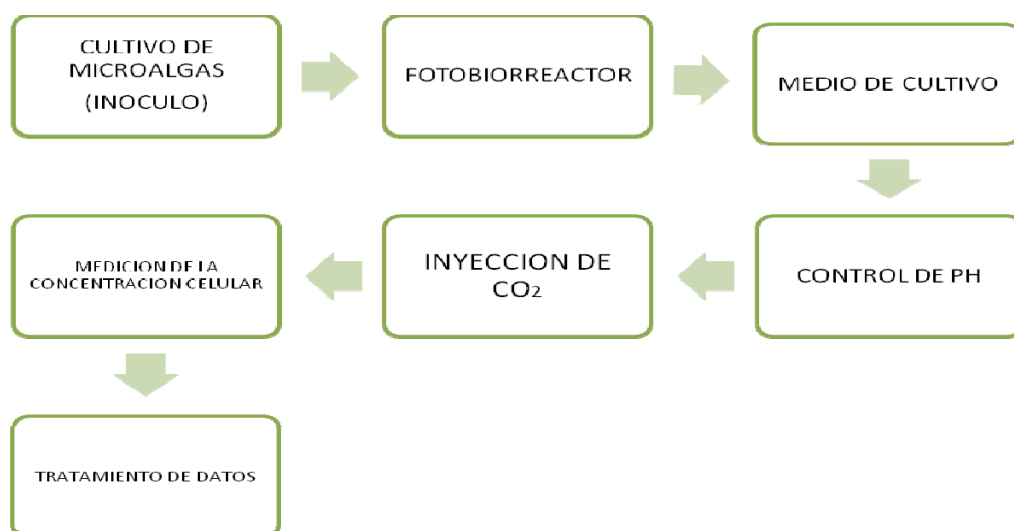
La Productividad (P) es calculada como máxima productividad (P_{max} , g / L.d) de acuerdo a la ecuación $P = (X_t - X_0) * (t - t_0)^{-1}$, donde X_0 es la concentración inicial de biomasa (g / L) en el tiempo t_0 (d) y X_t es la concentración de biomasa en (g / l) en cualquier tiempo t (d) subsecuente a t_0 (Schmidell et al. 2001).

La fijación de CO₂ acumulada, (FA, g) es determinada como $FA = (X_t - X_0) * m_{\text{cbm}} * V_{\text{vpt}} * (m_{\text{co2}} * m_c^{-1})^{-1}$, donde X_t es la concentración de biomasa (g / l) en el tiempo t (d) después de la inoculación (t_0), X_0 la concentración de biomasa (g / l) en t_0 , m_{cbm} la fracción másica de carbono en gramos de carbono por gramos de biomasa (g / g), V_{vpt} el volumen de trabajo (l) en el fotobioreactor, m_{co2} la masa molar de CO₂ (g / mol) y m_c la masa molar del carbono (g / mol).

La fijación diaria de CO₂ (FD) en g CO₂ fijado por g CO₂ inyectado por día (g / g . d) es $FD = (FA_{(t+1)} - FA_t) * m_{\text{id}}^{-1}$, donde $FA_{(t+1)}$ es la acumulación de CO₂ fijado durante $t + 1$ (d), FA_t es la acumulación de CO₂ durante t (d) y m_{id} (g) es la masa en gramos de CO₂ inyectados cada día. El máximo porcentaje global de fijación diaria de CO₂ también puede ser calculado (FD_{max} , %).

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Figura 3. Diagrama del proceso a escala laboratorio



2.1 Cultivo Microalgas (Inoculo)

Se utilizó 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 compuesto por NaNO₃: 0.25 g; MgSO₄·7H₂O: 0.075 g; NaCl: 0.025 g; K₂HPO₄: 0.075; KH₂PO₄: 0.175 g; CaCl₂·2H₂O: 0.025 g; H₃BO₃: 0.01142 g; KOH 0.031 g y 1 ml de Solución de metales.

2.2 Fotobiorreactor

Como reactores fueron usadas botellas de plástico de 2 litros y medio. Se usaron en total 12 reactores; 3 para hacer la prueba de pH, y 9 para realizar las inyecciones de CO₂. Los reactores fueron ubicados en el laboratorio de tal manera que recibieran buena cantidad de luz durante todo el ciclo del día. Cada reactor

tuvo una buena aireación, ya que constantemente se les suministro aire de un compresor (120 HP) durante todo el tiempo de cultivo y suministro de CO₂.

Figura 4. Fotobioreactor escala laboratorio



2.3 Medio de Cultivo

Se uso un medio de cultivo para freshwater algae, llamado Bold Basal (Anexo 1.), el cual fue preparado según las especificaciones de la tabla, para un volumen de trabajo de 2 litros. Se preparo el medio con las stock solutions y se afero el volumen que faltaba hasta 1,8 litros con agua destilada. Sea agregaron 200 ml de inoculo con una concentración inicial celular de 0,2788 g/L

2.4 Control de pH

Debido a que una alta acidez del medio puede causar la muerte de los microorganismos, se realizo un control del pH al cultivo, ya que cuando se inyecta CO₂, este se acidifica.

Para obtener resultados confiables se utilizaron tres reactores, se uso una alta presión (900 psi) para inyectar el CO₂ al medio, y unos tiempos de inyección altos, a diferentes intervalos; asegurando que el cultivo recibiera una buena cantidad de CO₂, para determinar como este influye en su acidez. Se midió el pH de los reactores cada hora y se realizo una curva para observar su comportamiento y si este alcanza cierto equilibrio.

2.5 Inyección de CO₂

Se realizaron inyecciones de CO₂ a 9 reactores durante 5 días, a diferentes intervalos de tiempo y diferentes pulsos desde las 8 a.m hasta las 6 p.m (ciclo de luz) de la siguiente manera;

R1; 6 % m/v, cada 15 minutos durante 88 segundos. **R2**; 12 % m/v, cada 15 minutos durante 176 segundos. **R3**; 18 % m/v, cada 15 minutos durante 264 segundos. **R4**; 6 % m/v, cada 30 minutos durante 88 segundos. **R5**; 12 % m/v, cada 30 minutos durante 176 segundos. **R6**; 18 % m/v, cada 30 minutos durante 264 segundos. **R7**; 6 % m/v, cada 60 minutos durante 88 segundos. **R8**; 12 % m/v, cada 60 minutos durante 176 segundos. **R9**; 18 % m/v, cada 60 minutos durante 264 segundos.

Para determinar la duración de los pulsos, se hallo la concentración de saturación de CO₂ en el agua usando la Ley de Henry.

Hallando la concentración de saturación, se calculan las concentraciones de 6%, 12% y 18% m/v de esa saturación, y conociendo el flujo del gas y su densidad, se puede hallar la duración necesaria de los pulsos de inyección.

2.6 Medición de Concentración Celular

- Medición de la absorbancia

Se tomaron dos muestras diarias de 3 ml (una muestra en la mañana antes de inyectar, y otra en la noche al terminar de inyectar), de cada reactor, y se agitaban

para asegurar una mayor homogeneidad, una de las muestras se diluyó en agua destilada hasta un volumen de 6 ml, esto se repetía en otros 3 envases de la misma manera; diluyendo 3 ml de la anterior dilución en agua destilada hasta alcanzar 6 ml. Luego se realizaba la medición de absorbancia con un espectrofotómetro (Spectroquant Phara 300 Merck). La concentración de cepa fue determinada según la ley de Beer-Lambert (Anexo 2.)

2.7 Tratamiento de datos

Al conocer el crecimiento de los diferentes cultivos gracias a las curvas de crecimiento realizadas, se pueden hallar otros parámetros para medir la eficiencia y caracterizar los cultivos tales como;

- Máximas tasas de crecimiento específico : (μ_{max}, d^{-1})
- Máxima Productividad ($P_{max}, g / L.d$): $P = (X_t - X_0) * (t - t_0)^{-1}$
- La fijación de CO₂ para cada microorganismo (FA , g) : $FA = (X_t - X_0) * m_{cbm} * V_{vpt} * (m_{co2} * m_c^{-1})^{-1}$

3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1 Tiempos de Inyección :

Usando la ley de Henry se hallaron los diferentes tiempos de inyección (Anexo 3.)

Para un flujo de $Q_{CO_2} = 0,1248$ g/s, el cual se mantuvo constante para los 9 reactores y se variaron los pulsos y los tiempos de inyección para cada uno;

$$C_1 (6\%) = 10,99 \text{ g/L}$$

$$t_{\text{inyeccion}} = 88 \text{ s}$$

$$C_2 (12\%) = 21,98 \text{ g/L}$$

$$t_{\text{inyeccion}} = 176 \text{ s}$$

$$C_3 (18\%) = 32,98 \text{ g/L}$$

$$t_{\text{inyeccion}} = 264 \text{ s}$$

3.2 Curvas de pH :

Las curvas obtenidas por la inyección de CO_2 bajo diferentes tiempos, indican que aunque se presenta una disminución del pH, después de un tiempo, se alcanza el equilibrio a un pH que se encuentra en el rango de tolerancia de la microalga. Por consiguiente si es posible tener cultivos de microalgas con inyección de CO_2 puro; ya que según lo demostrado por Hill (Hill_et_al_2001), aunque se inyecte grandes cantidades de CO_2 , el pH del medio llega a un equilibrio debido al consumo del CO_2 por parte de las microalgas y por la presencia de nitratos en el medio $P = 900$ psi

$$t_{\text{inyeccion}} = 300 \text{ s}$$

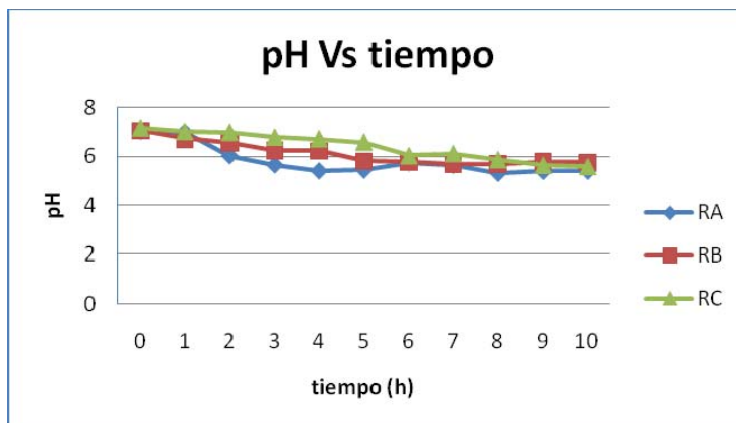
RA = Inyecciones cada 15 minutos

RB = Inyecciones cada 30 minutos

RC = Inyecciones cada 60 minutos

Figura 5. Curvas de control de pH

t (h)	RA	RB	RC
0	7,02	7,05	7,16
1	6,98	6,71	7,01
2	6,03	6,54	6,98
3	5,66	6,25	6,78
4	5,42	6,23	6,72
5	5,45	5,81	6,58
6	5,75	5,75	6,03
7	5,65	5,68	6,12
8	5,32	5,69	5,87
9	5,4	5,79	5,64
10	5,41	5,76	5,59



3.3 Curvas de variación de la Concentración (X) :

Por medio de la curva de calibración se obtuvo la formula $Y = 35,42 \cdot X + 0,0481$ la cual equivale a; $Abs = KL \cdot X$

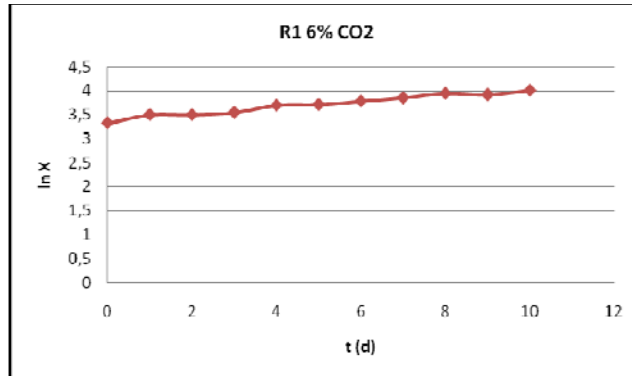
Para cada reactor se conocen las absorbancias (Y) y se conoce el $KL = 35,42$, y así se pueden hallar las diferentes concentraciones (X) (ANEXO 4) para cada intervalo de tiempo, y así determinar el crecimiento del cultivo.

Variación de concentración

Para los tres primeros reactores se mantuvo constante el intervalo de tiempo entre cada inyección de CO_2 . El cual se realizo cada 15 minutos:

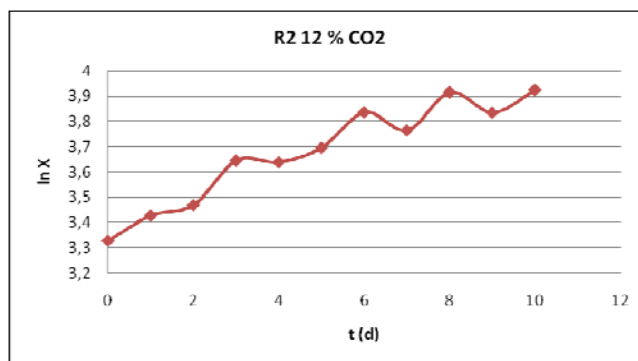
- Para el reactor 1 se realizaron inyecciones de CO_2 las cuales fueron de 88 segundos, durante un periodo de 5 días, en el ciclo diurno. Se pretende en cada inyección el reactor alcance una concentración del 6% en CO_2 . Las mediciones de absorbancia se realizaron dos veces al día (tabla 3)

Figura 6. Curva de concentración 6% m/v a 15 minutos.



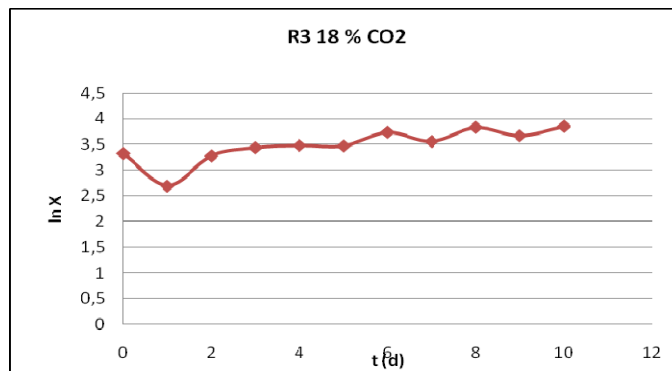
- Para el reactor 2 se realizaron inyecciones de CO₂ las cuales fueron de 176 segundos, durante un periodo de 5 días, en el ciclo diurno. Se pretende en cada inyección el reactor alcance una concentración del 12% de CO₂ teóricamente. (tabla 4)

Figura 7. Curva de concentración 12% m/v a 15 minutos



- Para el reactor 3 las inyecciones de CO₂ fueron de 264 segundos, durante un periodo de 5 días, en el ciclo diurno. Se pretende en cada inyección el reactor alcance una concentración del 18% de CO₂ teóricamente (tabla 5).

Figura 8. Curva de concentración 18% m/v a 15 minutos.



En las pruebas de inyección de CO₂ con un intervalo de 15 minutos el crecimiento celular tuvo un promedio de 0,0509 g/L. El mayor crecimiento se presentó con inyecciones a la más baja concentración (6% m/v) en el reactor 1, lo cual indica que no necesariamente a mayores concentraciones de CO₂, se va a presentar una mayor fijación del gas y va a existir un mayor consumo de este por parte de los microorganismos debido al exceso.

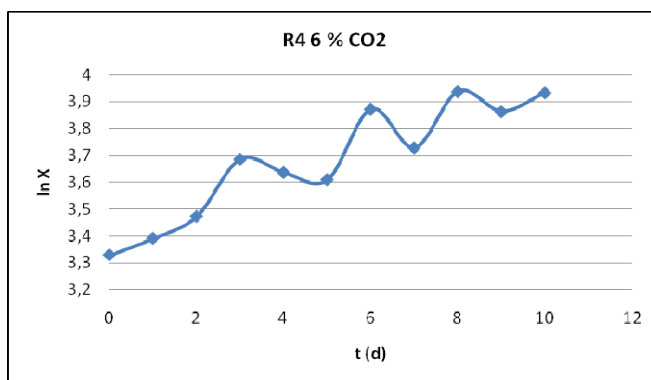
Aunque durante el intervalo de 15 minutos se inyecta la mayor cantidad de CO₂, el mejor crecimiento se da bajo una menor concentración, esto se debe a la velocidad de dilución del CO₂ dentro del reactor. Uno de los principales factores es la longitud de la columna del medio, ya que el CO₂ recorre rápidamente una corta columna, por lo cual no existe un tiempo de residencia suficiente del gas en el líquido que le permita solubilizarse, tendiendo como consecuencia que gran parte del CO₂ inyectado se escape; en cambio al existir una inyección con una concentración baja a intervalos cortos, se da una continua entrada de gas al

cultivo, permitiendo que mayor parte del CO₂ ingresado en el sistema sea consumido por las microalgas, minimizando la pérdida y aumentando el crecimiento celular.

Para los reactores 4,5 y 6 los intervalos de inyección fueron de 30 minutos:

- El reactor 4 recibió pulsos de 88 segundos cada media hora, con lo cual se pretendía alcanzar una concentración de 6% de CO₂ en ese instante.(tabla 6)

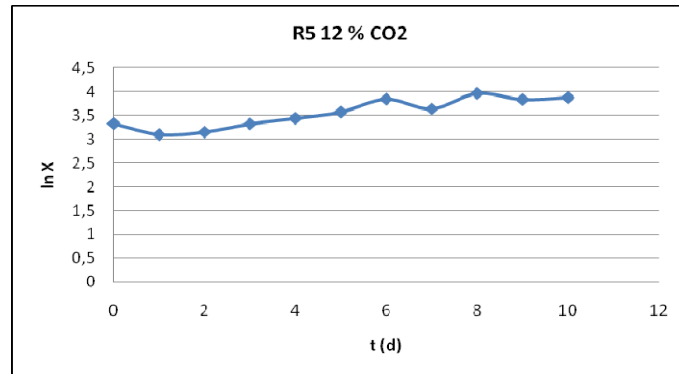
Figura 9. Curva de concentración 6% m/v a 30 minutos.



- El reactor 5 recibió pulsos de 176 segundos cada media hora, con lo cual se pretendía alcanzar una concentración de 12% de CO₂ en ese instante (tabla 7).

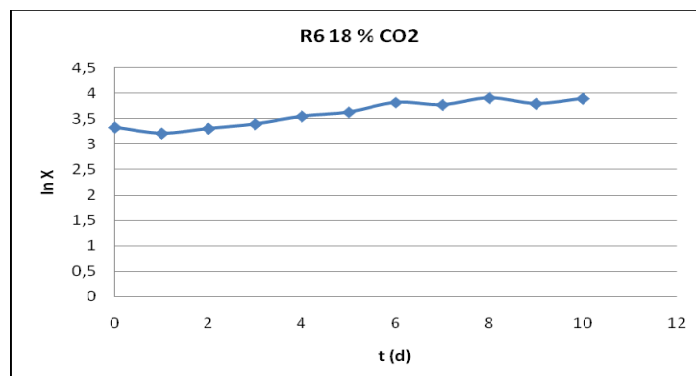
Los 9 reactores fueron ubicados de tal manera que las condiciones de luz temperatura, aireación, etc. fueran iguales para cada grupo de intervalo de tiempo, para que estos factores no fuesen un factor relevante en el proceso

Figura 10. Curva de concentración 12% m/v a 30 minutos.



- El reactor 6 recibió pulsos de 264 segundos cada media hora, con lo cual se pretendía alcázar una concentración de 18% de CO_2 .(tabla 8)

Figura 11. Curva de concentración 18% m/v a 30 minutos.



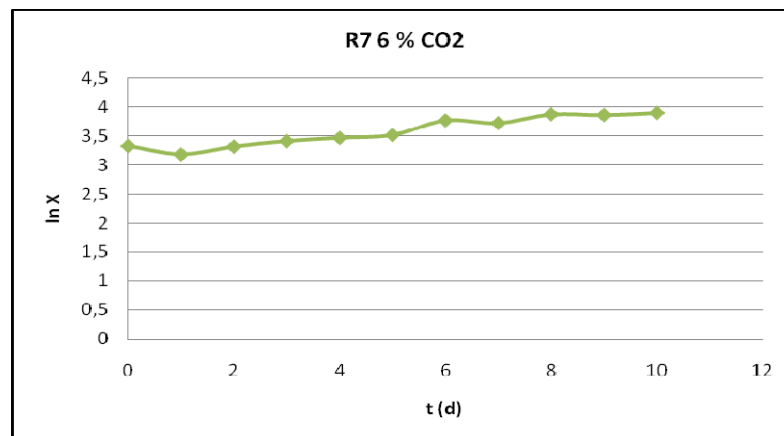
En las pruebas de inyección de CO_2 con un intervalo de 30 minutos el crecimiento celular tuvo un promedio de 0,0494 g/L. Se nota una disminución en el

crecimiento de biomasa global con respecto al que se presentó cada 15 minutos. Ocurre también que el mayor crecimiento se presentó en el reactor 4 al cual se le inyectó la menor concentración de CO₂ (6% m/v), lo cual fortalece la conclusión de que no se necesitan excesos de CO₂ dentro del cultivo, ya que es muy probable que las microalgas fijen o usen únicamente cierta cantidad de CO₂, el cual se puede pensar que no es tan alto, ya que a una concentración baja y a un mayor intervalo de tiempo entre las inyecciones, el crecimiento sigue siendo favorable. De esto se puede concluir que las microalgas toman el CO₂ necesario y les alcanza para tener un buen crecimiento, aunque pase un periodo considerable de tiempo (30 minutos) sin recibir más gas.

Reactores 7, 8 y 9 intervalos de 60 minutos a diferentes concentraciones de CO₂

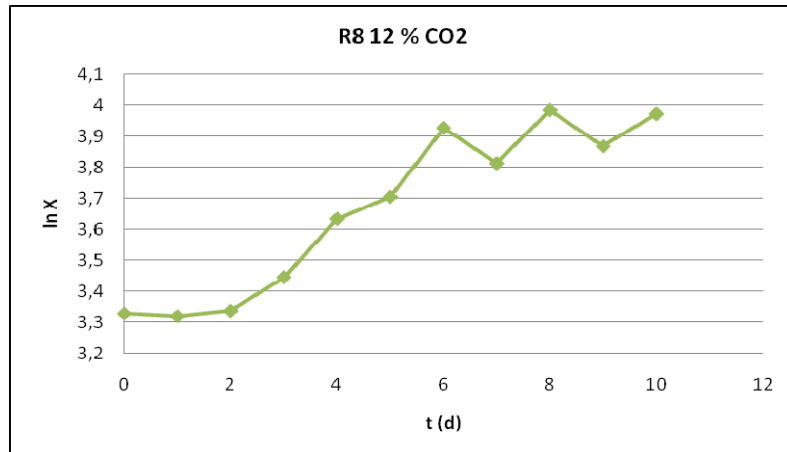
- El reactor 7 recibió un pulso de 88 segundos para alcanzar 6% de CO₂ (Tabla 9)

Figura 12. Curva de concentración 6% m/v a 60 minutos



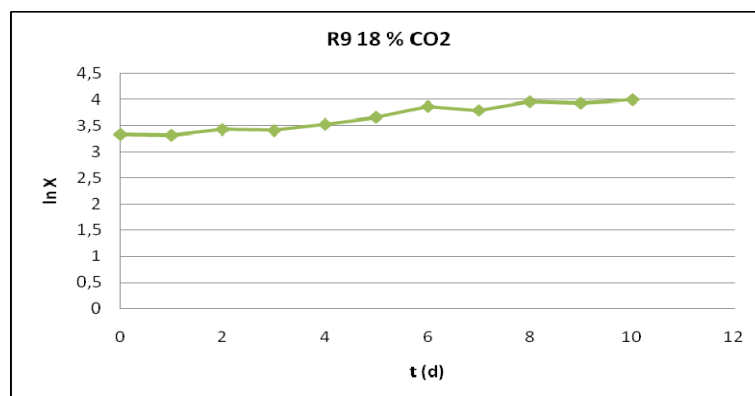
- El reactor 8 recibió pulsos de 176 segundos para alcanzar una concentración de 12% de CO₂. (tabla 10)

Figura 13. Curva de concentración 12 % m/v a 60 minutos.



- El reactor 9 recibe pulsos de 264 segundos cada hora. Este junto con el reactor 1 representan los extremos de la prueba. (tabla 11)

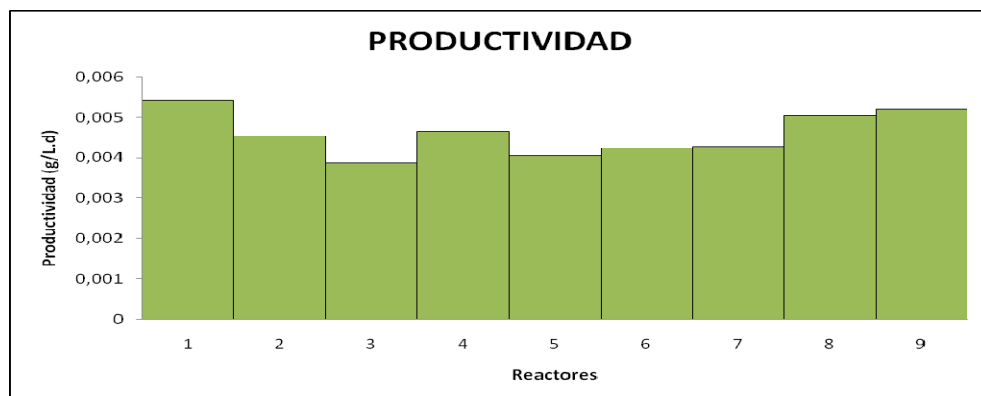
Figura 14. Curva de concentración 18% m/v a 60 minutos.



En las pruebas de inyección de CO₂ con un intervalo de 60 minutos el crecimiento celular tuvo un promedio de 0,0520 g/L. Este es el mejor promedio de los 3 intervalos, dejando ver que se presentó un buen crecimiento en los 3 reactores. Al contrario que en los intervalos de 15 y 30 minutos, acá se presentó un mayor crecimiento con la mayor concentración de CO₂ (18% m/v), y el crecimiento más bajo se dio con la menor concentración (6% m/v). De estos datos se puede decir que a intervalos más largos de tiempo, es decir, entre más tiempo dure el cultivo sin recibir CO₂, se presentaría un mayor crecimiento inyectándole concentraciones altas de gas. El cambio en la tendencia a este intervalo de 60 minutos con respecto a los otros dos, se puede presentar porque a concentraciones bajas, el alga no alcanza a fijar todo el CO₂ necesario para tener un buen rendimiento durante 60 minutos sin recibir alimento, por lo cual, el microorganismo prefiere captar todo el CO₂ disponible y así tener buena cantidad de reservas. También se puede deber a que el cultivo se acostumbró a inyecciones con altas concentraciones en intervalos largos, aprovechando la mayor cantidad de CO₂ que ingresa al sistema. Esto no quiere decir que el metabolismo se acelere debido a la gran cantidad de carbono y se presente un crecimiento mucho mayor al que se da inyectando concentraciones bajas a intervalos menores, pues el crecimiento más alto como se puede observar en las gráficas, sigue siendo el de 6% m/v cada 15 minutos.

3.4 Parámetros Cinéticos y Fijación de CO₂

Figura 15. Grafica Productividad en cada reactor



En la grafica de productividad (Figura 14.), (tabla 112) podemos corroborar los datos y las conclusiones obtenidas con las graficas de crecimiento. Se ve claramente que la mayor productividad se presenta a un bajo intervalo de tiempo, y con la concentración más pequeña, aunque en el mayor intervalo y con la concentración más alta, también se obtuvo una alta productividad. También se puede observar que en el intervalo de 30 minutos se presentaron bajas productividades exceptuando el reactor 4 que es un pico alto en la grafica. La observación más importante de esta figura es que en los extremos es donde se presenta una mayor productividad y también un mayor crecimiento celular.

En los diferentes intervalos de tiempo, se presentan caídas de la concentración celular durante la fase oscura, esto ocurre cuando existe un exceso de deposiciones tanto de carbohidratos como de lípidos, los cuales son aprovechados por las microalgas en ciclos donde no existe energía lumínica. Estas caídas en la concentración no existen en las graficas donde se presentó un mayor crecimiento neto, esto indica que aunque aparentemente en las inyecciones donde si ocurre

una mayor fijación de CO₂ este tipo de comportamiento no favorece a la producción final de biomasa; el reactor 4 se presenta como el punto intermedio de todo el experimento, donde tenemos una buena fijación en un tiempo medio (30 minutos) en la concentración mas baja inyectada, esto le permite a las microalgas tener suficiente energía almacenada, la cual puede ser aprovechada en ciclos oscuros.

En todos se vio un crecimiento considerable, con un promedio de 0,0508 g/L durante solo 5 días, donde en experimentos sin adición de CO₂ se requiere de mas tiempo. Aunque los intervalos de tiempo fueron largos (15, 30 y 60), se presentaron los picos de crecimiento tanto a los 15 como a los 60 minutos (R1 Y R9), lo cual demuestra que no es necesario inyectar constantemente para encontrar una buena fijación de CO₂.

4. CONCLUSIONES

Se encontró una incidencia muy positiva al inyectar CO₂ puro en un cultivo de microalgas, ya que en un periodo corto de solo 5 días se dobló la concentración de la biomasa en prácticamente todos los cultivos en comparación con un cultivo sin inyección de CO₂.

Se comprobó también que a pesar del potencial para acidificar el medio que tiene el CO₂ inyectado puro, el pH alcanzó un equilibrio en el cultivo, sin llegar a ser perjudicial para los microorganismos, lo cual muestra que a buenas concentraciones de CO₂ e intervalos considerables de tiempo entre cada inyección, las microalgas presentan un buen consumo de CO₂, el cual genera un crecimiento considerable y no deja que el pH baje a tal punto que mate a los organismos o inhiba su crecimiento.

La inyección de CO₂ puro en diferentes tiempos, dio como resultado que para que se presente un alto crecimiento celular, lo óptimo es realizar inyecciones a bajas concentraciones y cortos intervalos de tiempo (6% m/v cada 15 minutos), o inyectar altas concentraciones pero a intervalos de tiempo mayores (18% m/v cada 60 minutos).

La fijación de CO₂, la productividad y el crecimiento celular son directamente proporcionales, es decir, si se puede optimizar alguno de estos factores, se va a encontrar un incremento casi igual en el rendimiento de los otros.

La fijación de CO₂ dentro del cultivo no depende de los tiempos de inyección de este, ya que se comprobó que no necesariamente inyectar CO₂ en exceso o constantemente en pequeñas concentraciones implica que este sea captado en su totalidad por los microorganismos los cuales captan un máximo de CO₂ de 25 % v/v.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuras investigaciones que al realizar un cultivo, para mejorar su crecimiento, que se mantenga siempre con una entrada de aire, ya que este tiene pequeñas concentraciones de CO₂ que mantiene a los microorganismos autótrofos constantemente alimentados y además, la corriente de aire ayuda para el mezclado dentro del reactor, para así tener siempre el cultivo homogéneo e impedir que las microalgas se peguen a las paredes del reactor o se sedimenten.

Usar reactores tubulares, y que tengan una altura considerable (entre 50 cm y 1 m), porque de esta manera se garantiza un mayor tiempo de residencia de la burbuja de CO₂ dentro del cultivo, permitiendo una mayor solubilidad, difusión y al momento de realizar el análisis de las características de la biomasa obtenida se contara con una cantidad mas apreciable.

6. BIBLIOGRAFIA

Abalde A. & Cid A. & Fidalgo P. & Torres E. & Herrero C. 1995. Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Universidad de Da Coruña. 1- 210.

Avagyan A.B. (2008). A contribution to global sustainable development: inclusion of microalgae and their biomass in production and bio cycles. *Clean.Tech. Environ. Policy*. 10:313-317.

Babcock, R. W., Malda, J., and Radway, J. C. 2002. Hydrodynamics and mass transfer in a tubular air-lift photobioreactor. *J. Appl. Phycol*. 14:169–84.

Bailey JE, Ollis DF (1986) *Biochemical engineering fundamentals*, 2nd ed. McGraw-Hill, Singapore.

Barbosa, B. Jansen, M. Ham, N. (2003a). Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. *Biotechnol Bioeng* 82:170–179.

Becker E.W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology*. cambridge press University.

Borja, R. Traviesoa, L. Hall, D. O. Rao, K. K. Benitez, F. Sanchez, E. (2001). A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. *International Biodeterioration & Biodegradation* 47, 51–155.

Borowitzka, M.A. (1999). Commercial production of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes and Fermentes. *Journ Biotech*. 70: 313-321.

Chisti Y. (2007). Biodiesel form Microalgae. *Biotech Adv*. 25: 294-306.

Chisti Y. (2008) Response to Reijnders: Do biofiels from Microalgae beats biofuels from terrestrial plants. *Trends Biotech*. pp. 26: 7-7.

- Csögör Z., Herrenbauer M., Schmidt K., Posten C. (2001). Light distribution in a novel photobioreactor – modelling for optimization. *Journ Appl Phycol* 13: 325–333.
- Delente, J., Behrens, P. W., and Hoeksema, S. D. 1992. Closed photobioreactor and method of use. U.S. Patent 5,151,347.
- Degen J., Uebele A., Retze A., Schmid-Staiger U., Trosch W. (2001). A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *Journ of Biotech* 92 89–94.
- Hannagata N., Takeuchi T., Fukuju Y., Barnes D and Karube I. (1992). Tolerance of microalgae to High CO₂ and high temperature. *Phytochemistry*. 31: 3345-3348.
- 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. Res.* 45, 5796-5800.
- Janssen, M., Kuijpers, T. C., Veldhoen, B., Ternbach, M. B., Tramper, J., Mur, L. R., Wijffels, R. H. (1999). Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light: dark cycles: 13–87 s. *Journ Biotech* 70 (1999) 323–333.
- Kalia V.C., Purohit H.J. (2008). Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 35: 403-419.
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press, New York, 509 pp.
- Lee C. G. (1999). Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 4, 78-81.
- Lee, Y. K., and Pirt, S. J. 1984. CO₂ absorption rate in an algal culture: effect of pH. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34B:28–32.
- Li Q., Du W., Liu D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotech.* 80:749–756.

- Ma, F. Hanna, M. (1999) Biodiesel production: a review. *Biores Tech*, 70: 1-15
- Meng X. Yang J. Xu X. Zhang L. Nie Q. Xian M. (2008). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Rev. Ener.* 34:1-5.
- Merchuk, J. C., Gluz, M., and Mukmenev, I. 2000. Comparison of photobioreactors for cultivation of the red microalga *Porphyridium* sp. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75:1119–26.
- Metcalf and Eddy. 1991 *Wastewater Engineering*. McGraw Hill, New York.
- Miao X. Wu Q. (2004). High yield bio-oil production form fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J. Biotech.* 110: 85-93.
- Morita, M., Watanabe, Y., Okawa, T., and Saiki, H. 2001. Photosynthetic productivity of conical helical tubular photobioreactors incorporating *Chlorella* sp. under various culture medium flow conditions. *Biotechnol. Bioengin.* 74:136–44.
- Oncel, S. Sukan , F. V. (2008). Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Artrospira platensis* (*Spirulina platensis*). *Biores Technol* 99 4755–4760.
- Pirt, S. J. 1983. Maximum photosynthetic efficiency: a problem to be resolved. *Biotechnol. Bioeng.* 25:1915–22.
- Pöpel, H.J. 1995. *Aeration and Gas Transfer*.
- Radmer, R. J., Behrens, P. W., and Arnett, K. L. 1987. An analysis of the productivity of a continuous algal culture system. *Biotechnol. Bioeng.* 24:488–92.
- Richmond A (1996) Efficient utilization of high irradiance for production of photoautotrophic cell mass: a survey. *J. Appl. Phycol.* 8: 381-387.
- Song, D. Fu, J. Shi, D. (2008). Exploitation of Oil-Bearing Microalgae for Biodiesel. *Chin. Jour. Biotech.* 24: 341-348.
- Sonnleitner, B., 1999. Instrumentation of small scale bioreactors. In: Demain, A. L., and Davies, J. E., eds. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM Press, Washington, D.C., 221–35.
- Stewart C. Hessami M. (2005). A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration—the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. *Ener conver and Manag.* 46: 403-420.

Van, Gerpen, J. (2005). Biodiesel processing and production. *Fuel. Process. Technol.* 86:1097-1107.

7. ANEXOS

ANEXO 1. COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO.

En la siguiente tabla se muestran las diferentes composiciones de las stock solutions, necesarias para preparar el medio de cultivo Bold Basal para un volumen de trabajo de 1 Litro;

Tabla 1. Composición del medio de cultivo

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 Stock 1 - 6	10 ml cada una
Soluciones Stock 7 - 10	1 ml cada una

ANEXO 2. MEDICION DE LA CONCENTRACION DE CEPAS SEGUN LA LEY DE BEER-LAMBERT.

Para hallar la concentración de la cepa cuando se hallan absorbancias por espectrofotometría, se puede recurrir a la Ley de Beer-Lambert que dice;

$$\mathbf{Abs = KXL}$$

Abs: La absorbancia

K: Coeficiente de extinción molar

X: Concentración

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

El coeficiente de extinción molar se determina realizando una serie de diluciones de la sustancia de interés. Luego se mide la absorbancia de cada muestra de dilución a un largo de onda determinado de 500 nm. Los valores de absorbancia son graficados en función de la concentración. El resultado debe ser una línea recta. La pendiente de la línea ($\Delta y/\Delta x$) es el coeficiente de extinción (KL).

Balance de biomasa reactor discontinuo

Producción de x = acumulación de x

Tasa de crecimiento población celular - Tasa de desaparición población celular =
Acumulación de x

$$rx - rd = \frac{dx}{dt}$$

Donde:

$$rx = \mu x; rd = \alpha x; \mu \gg \alpha$$

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

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

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

Resolviendo: $\ln x = \ln x_0 + \mu t$

Ecuación que caracteriza la fase exponencial de crecimiento poblacional celular.

ANEXO 3. DETERMINACION DE TIEMPOS DE INYECCION.

Para hallar los tiempos de inyección, se utilizo la Ley de Henry, que hace referencia a que la solubilidad de un gas en un liquido es directamente proporcional a la presión parcial que ejerce el gas sobre el liquido.

$$C_s = k_D \cdot P$$

k_D = coeficiente de distribución = $3,4 \times 10^{-2}$ (mol/L.atm) a 25°C

P = presión de CO₂ = 900 psi = 61,2414 atm.

Entonces, la concentración de saturación es;

$$C_s = 2,082 \text{ mol CO}_2/\text{L}$$

Si se multiplica por el peso molecular del CO₂ (44 g/mol), la concentración queda;

$$C_s = 91,608 \text{ g CO}_2/\text{L}$$

Para un volumen de trabajo de 2 Litros seria;

$$(1) C_s = 183,216 \text{ g CO}_2/\text{L}$$

Se inyecta CO₂ a un caudal de 10 SCHF que es igual;

$$(2) Q_g = 0,0786 \text{ L CO}_2/\text{s}$$

Se conoce que la densidad del CO₂ es;

$$(3) D_g = 1,6 \text{ g/L}$$

Ahora multiplicando (2) y (3) se tiene el siguiente flujo de CO₂;

$$(4) F_g = 0,125 \text{ g CO}_2/\text{s}$$

Se sabe que la concentración de saturación o equilibrio del CO₂ en el líquido es C_s , y se quieren inyectar concentraciones del 6%, 12% y 18%, entonces se calculan estos porcentajes para la concentración de saturación así;

$$C_1 (6\%) = 0,06 * C_s = 10,993 \text{ g CO}_2/\text{L}$$

$$C_2 (12\%) = 0,12 * C_s = 21,98 \text{ g CO}_2/\text{L}$$

$$C_3 (18\%) = 0,18 * C_s = 32,97 \text{ g CO}_2/\text{L}$$

Conociendo las diferentes concentraciones (C_1 , C_2 , C_3), y el flujo de gas F_g , se pueden hallar los tiempos de inyección así;

$$t_1 = C_1 / F_g = 87,94 \text{ s}$$

$$t_2 = C_2 / F_g = 175,88 \text{ s}$$

$$t_3 = C_3 / F_g = 263,83 \text{ s}$$

ANEXO 4. DETERMINACION CURVA DE CALIBRACION Y LAS CONCENTRACIONES EN CADA REACTOR.

Se realizo peso seco para determinar la concentración celular en el Inoculo, y se midieron las absorbancias al momento de sacar la muestra para pesar.

Se realizaron 2 tomas de peso seco utilizando 50 ml de cultivo, y se midieron las absorbancias de las 2 muestras, esto con el objetivo de tener original y copia y así minimizar el error.

Con estos datos de absorbancias y concentraciones, se aplica la Ley de Beer-Lambert;

$$\mathbf{Abs = KXL}$$

Para realizar las curvas de calibración de X vs Abs, a las cuales se les realiza una línea de tendencia. La ecuación de esa recta de forma $Y = mX + B$, es la misma ecuación de la Ley de Beer-Lambert. Se escoge la ecuación que tenga un mayor coeficiente de correlación (R^2), y esta ecuación se usa para despejar las concentraciones para los reactores de esta manera;

$(Y - B)/m = X$, donde;

- Y = absorbancia
- m = Coeficiente de extinción KL

Tabla 2. Concentraciones y absorbancias curvas de calibración

DATOS INICIALES			
Peso FILTRO 1 (g)	1,752		
Peso FILTRO 2 (g)	1,75		
Peso muestra 1 (g)	1,8217		
Peso muestra 2 (g)	1,827		
Concentración 1 (g)	0,0697		
Concentración 2 (g)	0,077		
Abs 1		Abs 2	
[]	2,426	[]	2,395
dilución 1	1,455	dilución 1	1,465
dilución 2	0,711	dilución 2	0,92
dilución 3	0,328	dilución 3	0,396
dilución 4	0,152	dilución 4	0,198
X1	Abs 1	X2	Abs 2
0	0	0	0
0,0697	2,426	0,077	2,395
0,03485	1,455	0,0385	1,465
0,017425	0,711	0,01925	0,92
0,0087125	0,328	0,009625	0,396
0,00435625	0,152	0,0048125	0,198

Figura 16. Curva de calibración X vs Abs. Para muestra original

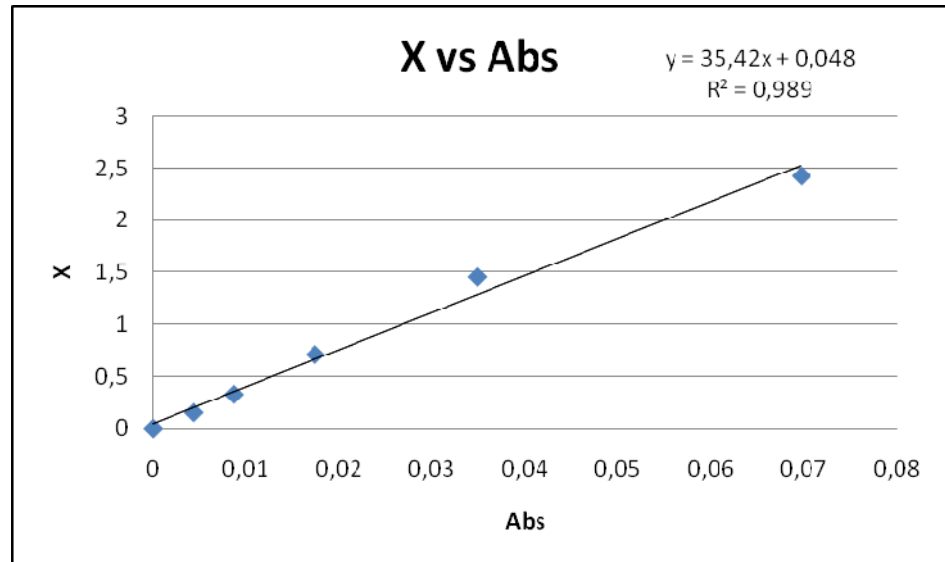
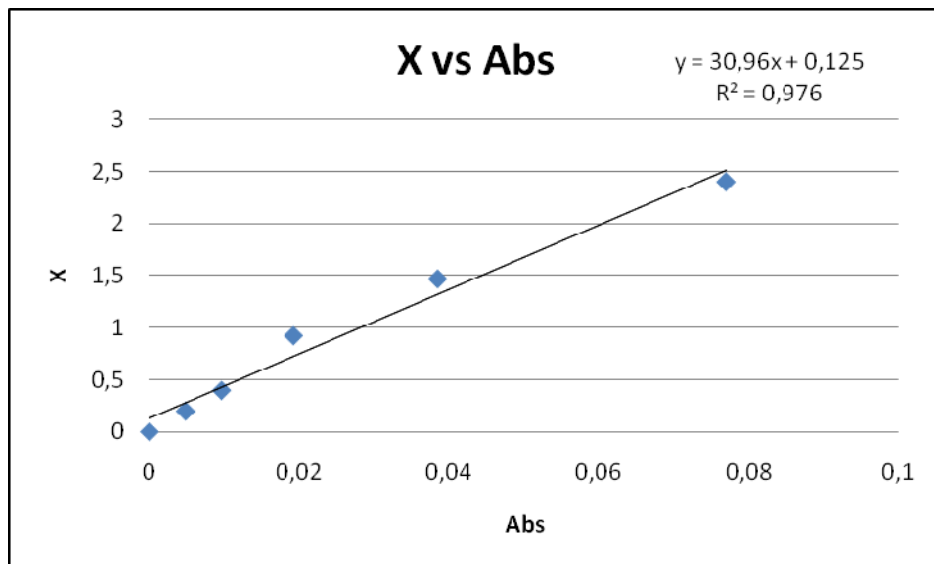


Figura 17. Curva de calibración X vs Abs. para muestra copia



El mejor coeficiente de relación lo tiene la ecuación de la Figura 15. Por consiguiente se toma la ecuación de la recta para hallar las concentraciones en los diferentes reactores;

$$X = (\text{Abs} - 0,0481) / (35,42)$$

Con la anterior ecuación realizan las tablas de concentración (X) y absorbancia (Abs) para los 9 reactores, y a partir de estas tablas se construyen las graficas para expresar el crecimiento de la biomasa en el tiempo.

Tabla 3. Concentraciones y absorbancias Reactor 1

t	Abs	X (mg/L)	Ln X	X (g/L)
0		27,88	3,32791	0,02788
1	1,219	33,05759	3,498251	0,0330576
2	1,219	33,05759	3,498251	0,0330576
3	1,276	34,66685	3,545784	0,0346669
4	1,477	40,34161	3,697384	0,0403416
5	1,498	40,9345	3,711973	0,0409345
6	1,607	44,01186	3,784459	0,0440119
7	1,72	47,20215	3,854439	0,0472021
8	1,878	51,6629	3,94474	0,0516629
9	1,828	50,25127	3,917036	0,0502513
10	1,996	54,99435	4,007231	0,0549944

Tabla 4. Concentraciones y absorbancias Reactor 2

t	Abs	X (mg/L)	Ln X	X(g/L)
0		27,88	3,32791	0,02788
1	1,138	30,77075	3,426565	0,0307708
2	1,185	32,09768	3,468784	0,0320977
3	1,403	38,2524	3,644206	0,0382524
4	1,394	37,99831	3,637542	0,0379983
5	1,474	40,25692	3,695282	0,0402569
6	1,687	46,27047	3,834504	0,0462705
7	1,575	43,10841	3,763718	0,0431084
8	1,822	50,08187	3,913659	0,0500819
9	1,685	46,214	3,833283	0,046214
10	1,839	50,56183	3,923197	0,0505618

Tabla 5. Concentraciones y absorbancias Reactor 3.

t	Abs	X (mg/L)	Ln X	X(g/L)
0		27,88	3,32791	0,02788
1	0,571	14,76285	2,692114	0,0147628
2	0,99	26,59232	3,280622	0,0265923
3	1,15	31,10954	3,437515	0,0311095
4	1,199	32,49294	3,481023	0,0324929
5	1,187	32,15415	3,470542	0,0321542
6	1,539	42,09204	3,739859	0,042092
7	1,292	35,11858	3,55873	0,0351186
8	1,687	46,27047	3,834504	0,0462705
9	1,439	39,26877	3,67043	0,0392688
10	1,721	47,23038	3,855037	0,0472304

Tabla 6. Concentraciones y absorbancias Reactor 4.

t	Abs	X (mg/L)	Ln X	X(g/L)
0		27,88	3,32791	0,02788
1	1,099	29,66968	3,390126	0,0296697
2	1,189	32,21062	3,472296	0,0322106
3	1,46	39,86166	3,685415	0,0398617
4	1,392	37,94184	3,636054	0,0379418
5	1,356	36,92547	3,608901	0,0369255
6	1,751	48,07736	3,872811	0,0480774
7	1,522	41,61208	3,728391	0,0416121
8	1,867	51,35234	3,938711	0,0513523
9	1,735	47,62564	3,863371	0,0476256
10	1,858	51,09825	3,93375	0,0510982

Tabla 7. Concentraciones y absorbancias Reactor 5.

t	Abs	X (mg/L)	Ln X	X(g/L)
0		27,88	3,32791	0,02788
1	0,831	22,10333	3,095728	0,0221033
2	0,874	23,31733	3,149197	0,0233173
3	1,029	27,69339	3,321194	0,0276934
4	1,151	31,13778	3,438422	0,0311378
5	1,306	35,51383	3,569922	0,0355138
6	1,7	46,63749	3,842405	0,0466375
7	1,392	37,94184	3,636054	0,0379418
8	1,915	52,70751	3,964758	0,0527075
9	1,685	46,214	3,833283	0,046214
10	1,754	48,16206	3,874571	0,0481621

Tabla 8. Concentraciones y absorbancias Reactor 6.

t	Abs	X (mg/L)	Ln X	X(g/L)
0		27,88	3,32791	0,02788
1	0,926	24,78543	3,210256	0,0247854
2	1,014	27,2699	3,305784	0,0272699
3	1,103	29,78261	3,393925	0,0297826
4	1,276	34,66685	3,545784	0,0346669
5	1,377	37,51835	3,62483	0,0375184
6	1,657	45,42349	3,816029	0,0454235
7	1,584	43,36251	3,769595	0,0433625
8	1,807	49,65839	3,905167	0,0496584
9	1,62	44,37888	3,792764	0,0443789
10	1,785	49,03727	3,892581	0,0490373

Tabla 9. Concentraciones y absorbancias Reactor 7.

t	Abs	X (mg/L)	Ln X	X(g/L)
0		27,88	3,32791	0,02788
1	0,904	24,16431	3,184877	0,0241643
2	1,024	27,55223	3,316083	0,0275522
3	1,12	30,26256	3,409911	0,0302626
4	1,181	31,98475	3,465259	0,0319848
5	1,239	33,62225	3,515188	0,0336222
6	1,58	43,24958	3,766987	0,0432496
7	1,512	41,32976	3,721583	0,0413298
8	1,748	47,99266	3,871048	0,0479927
9	1,729	47,45624	3,859808	0,0474562
10	1,792	49,2349	3,896603	0,0492349

Tabla 10. Concentraciones y absorbancias Reactor 8.

t	Abs	X (mg/L)	Ln X	X(g/L)
0		27,88	3,32791	0,02788
1	1,027	27,63693	3,319153	0,0276369
2	1,044	28,11688	3,33637	0,0281169
3	1,158	31,3354	3,444749	0,0313354
4	1,387	37,80068	3,632327	0,0378007
5	1,486	40,59571	3,703662	0,0405957
6	1,843	50,67476	3,925428	0,0506748
7	1,65	45,22586	3,811669	0,0452259
8	1,949	53,66742	3,982806	0,0536674
9	1,74	47,7668	3,866331	0,0477668
10	1,926	53,01807	3,970633	0,0530181

Tabla 11. Concentraciones y absorbancias Reactor 9.

t	Abs	X (mg/L)	Ln X	X(g/L)
0		27,88	3,32791	0,02788
1	1,019	27,41107	3,310947	0,0274111
2	1,135	30,68605	3,423808	0,0306861
3	1,111	30,00847	3,40148	0,0300085
4	1,242	33,70695	3,517704	0,0337069
5	1,419	38,70412	3,655946	0,0387041
6	1,721	47,23038	3,855037	0,0472304
7	1,603	43,89893	3,78189	0,0438989
8	1,883	51,80407	3,947469	0,0518041
9	1,83	50,30774	3,918159	0,0503077
10	1,957	53,89328	3,987006	0,0538933

Teniendo las concentraciones de biomasa diaria en todos los reactores, durante el tiempo de inyección de CO₂, se pueden hallar otros parámetros cinéticos como la

Productividad (g/L.d) y las máximas tasa de crecimiento específico μ_{max} (d^{-1}).
También se puede hallar la fijación de CO₂ en los microorganismos FA (g CO₂).

Tabla 12. Tasas de crecimiento específico y productividades.

Reactores	μ_{max}	Pmax (g/L.d)
R1	0,67932093	0,005422871
R2	0,59528735	0,004536366
R3	0,52712771	0,003870076
R4	0,60584066	0,00464365
R5	0,54666189	0,004056411
R6	0,56467098	0,004231453
R7	0,56869305	0,004270979
R8	0,64272319	0,005027614
R9	0,65259093	0,005202656

Tabla 13. Fijación de CO₂.

t(d)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
1	0,001412071	0,00115	0,000881	0,0011811	0,000888	0,000519	0,00065	6,46E-05	0,000765
2	0,003398622	0,00276	0,001258	0,0027441	0,002082	0,001851	0,001119	0,002706	0,001589
3	0,004399598	0,005016	0,003876	0,0055084	0,005116	0,004785	0,004192	0,006217	0,005277
4	0,006486246	0,006055	0,005016	0,0064015	0,006771	0,00594	0,005485	0,007033	0,006525
5	0,007394824	0,006186	0,005277	0,0063322	0,005531	0,00577	0,005824	0,006856	0,007095