

**INFLUENCIA EN LA INYECCIÓN CONTINUA DE CO₂ EN EL CRECIMIENTO DE
Chlorella vulgaris UTEX 1803 EN FOTOBIOREACTORES A ESCALA DE
LABORATORIO**

**CARLOS AUGUSTO GODOY RUIZ
JUAN DAVID MONROY AVILA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA**

2011

**INFLUENCIA EN LA INYECCIÓN CONTINUA DE CO₂ EN EL CRECIMIENTO
DE *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 EN FOTOBIOREACTORES A ESCALA DE
LABORATORIO**

**CARLOS AUGUSTO GODOY RUIZ
JUAN DAVID MONROY AVILA**

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

Directores

Ph. D Viatcheslav Kafarov

M.Sc. Crisóstomo Barajas

Codirector

Biólogo. Andrés Fernando Barajas Solano

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICO-QUIMICAS
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
BUCARAMANGA**

2011

*A Dios, por toda la sabiduría que me entrego
A mi madre, abuela, por enseñarme a ser lo que soy
A mi familia por su apoyo, entrega, constancia, amor y soporte en los momentos
más difíciles
Y a todas las personas que siempre han creído en mí.*

Carlos Augusto Godoy Ruiz

*A Dios por sus grandes enseñanzas y permitirme culminar esta etapa de mi vida
satisfactoriamente,
A mi maestra y madre, Maria Amanda Avila quien me ha brindado su amor,
comprensión y total apoyo durante mi vida,
A mi familia y amigos por su compañía, consejos y gratos momentos.*

Juan David Monroy Avila

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, por su apoyo económico.
- INSTITUTO COLOMBIANO DEL PETROLEO, por su aporte en el marco de este proyecto.
- UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, por brindarnos los conocimientos que fueron base para el desarrollo de este trabajo.
- CORPORACIÓN INSTITUTO MOSRROSQUILLO, por proveer las algas a trabajar.
- GRUPO DE INVESTIGACION CIDES, y al laboratorio de biomasa, por suministrar los medios necesarios para lleva a cabo esta investigación.
- Dr. VIATCHESLAV KAFAROV, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por su respaldo como líder del proyecto.
- M.Sc CRISOSTOMO BARAJAS FERREIRA, por su gran aporte científico.
- ANDRES FERNANDO BARAJAS, por su valioso apoyo y dedicación.
- EDUARDO CARREÑO Y WILSON CARREÑO, por su colaboración y orientación incondicional.
- Ing. SANTIAGO DIAZ RUEDA, por su incondicional colaboración.
- A Dios, a nuestras familias y amigos, por su apoyo y por ser nuestra fortaleza.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	18
1.1 GENERALIDADES	18
1.1.1 <i>Chlorella vulgaris</i> .	19
1.2 FOTOSÍNTESIS Y RESPIRACIÓN	19
1.3 REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO	20
1.3.1 Luz	21
1.3.2 Fuente de carbono	22
1.3.3 Medio de cultivo	24
1.3.4 Temperatura	25
1.3.5 pH	25
1.4 SISTEMAS DE CULTIVO	26
1.5 CONCEPTOS DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICOS.	27
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	28
2.1 MÉTODOS DE CULTIVO	28
2.2 FOTOBIOREACTORES	29
2.3.1 Concentración de Biomasa	29
2.3.2 Concentración de Clorofila total	30
2.3.3 Otros métodos	30
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
3. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.	32
3.1 ANALISIS ESTADISTICO	37

3.1.1 Diseño factorial variable de respuesta P_{\max} .	37
3.1.2 Diseño factorial variable de respuesta C_{a+b} .	40
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXOS	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Montaje de laboratorio.	29
Figura 2. Concentración de biomasa (g L^{-1}) obtenida a partir de (Aire+2,3%CO ₂).	32
Figura 3. Concentración de clorofila (mg L^{-1}) obtenida a partir de (Aire-2,3%CO ₂).	34
Figura 4. Concentración de biomasa (g L^{-1}) obtenida a partir de (Aire+3,8%CO ₂).	34
Figura 5. Concentración de clorofila (mg L^{-1}) obtenida a partir de (Aire+3,8%CO ₂).	35
Figura 6. Producción de biomasa a diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno	36
Figura 7. Producción de biomasa a diferentes concentraciones nitrógeno a 3,8%CO ₂ .	36
Figura 8. Respuesta promedio de cada combinación.	40
Figura 9. Respuesta promedio de cada combinación para datos $C_{(a+b)}$.	41

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.Velocidades máximas específicas de crecimiento (μ_{MAX}) fase 1.	33
Tabla 2.Velocidades máximas específicas de crecimiento (μ_{MAX}) fase 2	34
Tabla 3. Factores y niveles para variable de respuesta Productividad.	38
Tabla 4. Disposición general para el diseño bifactorial en la variable de respuesta Productividad ($g L^{-1} día^{-1}$).	38
Tabla 5.Análisis de varianza para P_{max} .	39
Tabla 6. Factores y niveles para variable de respuesta $C_{(a+b)}$.	40
Tabla 7. Análisis de varianza para $C_{(a+b)}$.	41

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. REACTIVOS	55
ANEXO 2. MEDIO BOLD BASAL.	56
ANEXO 3. MONTAJE DEL CULTIVO DE <i>C. vulgaris</i> .	58
ANEXO 4. PORCENTAJE DE CO ₂ UTILIZADO.	60
ANEXO 5. MÁXIMA SOLUBILIDAD TEÓRICA DEL DIÓXIDO DE CARBONO EN EL MEDIO.	61
ANEXO 6. ANÁLISIS DEL DISEÑO FACTORIAL, DATOS SOFTWARE DEMO-MINITAB.	63
ANEXO 7. RELACION DENSIDAD OPTICA – BIOMASA	67
ANEXO 8. ANÁLISIS CINÉTICO DE LOS CULTIVOS	68

RESUMEN

TITULO: EFECTO DE LA INYECCION CONTINUA DE CO₂ EN EL CRECIMIENTO DE *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803 EN FOTOBIOREACTORES A ESCALA LABORATORIO.*

AUTORES: CARLOS AUGUSTO GODOY RUIZ,
JUAN DAVID MONROY AVILA.**

PALABRAS CLAVES: Microalgas, Cultivo Autotrófico, *Chlorella Vulgaris*, Dióxido de carbono, Fotobioreactores.

Las microalgas han sido sugeridas como una respuesta adecuada para la producción de combustibles debido a sus ventajas relacionadas con altas tasas de crecimiento, alta eficiencia fotosintética y alta producción de biomasa comparada con otros cultivos terrestres energéticos.

Se estudió el efecto de la inyección continua de CO₂ en la productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 a escala de laboratorio, mediante la variación en la cantidad de CO₂ inyectado y de nitrato de sodio (NaNO₃) presente en el medio. El cultivo se desarrolló de manera fotoautótrofa, utilizando como medio de crecimiento el medio Bold Basal.

Se realizaron cultivos en condiciones Autotróficas a 23±1°C, con ciclos luz-oscuridad 12:12h por triplicado durante periodos establecidos de 5 días. Los cultivos se efectuaron a concentraciones de NaNO₃ (0,59mM; 1,18mM; 1,76mM; 2,35mM) y flujos continuos con % (v/v) CO₂ (2,3; 3,8). Finalmente se analizó el comportamiento entre las mejores concentraciones de NaNO₃ (0,59mM; 1,18mM) tomando un punto medio y manteniendo el mejor flujo de CO₂. Todos los cultivos se preadaptaron a la presencia de CO₂ en el medio.

Para los experimentos realizados, las mejores productividades fueron 0,28(g L⁻¹ d⁻¹) y 0,44(g L⁻¹ d⁻¹) a condiciones (2,23 %CO₂, 0,59mM NaNO₃) y (3,8 %CO₂, 1,18mM NaNO₃) respectivamente.

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación para el Desarrollo Sostenible en Industria y Energía (CIDES) de la escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander en apoyo del Ministerio de Agricultura y el Instituto Colombiano de Petróleo (ICP). Proyecto, Bioprospección de Microalgas Colombianas para la producción de biodiesel.

*Proyecto de grado

**Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Ph.D.

Viatcheslav Kafarov y M.Sc. Crisóstomo Barajas. Codirector: Biólogo Andrés Fernando Barajas S.

ABSTRACT

TITLE: INFLUENCE OF *Chlorella Vulgaris* GROWTH UNDER CO₂ FLOW IN LABORATORY-SCALE PHOTOBIOREACTORS.*

AUTHORS: CARLOS AUGUSTO GODOY RUIZ,
JUAN DAVID MONROY AVILA.**

KEY WORDS: Microalgae, Autotrophic culture, *Chlorella vulgaris*, *Carbon d. photobioreactors*.

Among many attempts to reduce the quantity of CO₂ in the atmosphere, biotechnology using microalgae in a photo-bioreactor has extensively been studied. CO₂ sequestering by Microalgae could become a profitable industry that would help to mitigate global warming (GLW) and probably, enable environmentally neutral utilization of fossil fuels until their full replacement by alternative energy sources.

The aim of this study was to find the influence of microalgae growth under two different CO₂ flows. The algal strain used in this work was *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 was cultured using Bold Basal Medium in accordance with using artificial freshwater formulation (Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, The UK). Microalgae was grown in photobioreactors (PBR) with 2000 ml of culture at 23±1°C under 12/12 hours light/dark cycles with constant CO₂ flow. Illumination was provided by four fluorescent lights combined to give the desired light intensity.

The growth response of *C. vulgaris* was studied under varying concentrations of carbon dioxide (%v/v) (2,3; 3,8) and sodium nitrate as nitrogen source NaNO₃ (0,59mM; 1,18mM; 1,76mM; 2,35mM). Later, an additional experiment was carried out between the best productivity conditions. The highest Productivity (0,44g L⁻¹ d⁻¹), and chlorophyll concentration (69,46mg L⁻¹) were recorded at 3,8% CO₂ level and 1,18mM NaNO₃.

This work is part of the "Bioprospecting Colombian Microalgae for biodiesel production" code 2008D32006-6710 funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development, with the participation of the Universidad Industrial de Santander, the Colombian Petroleum Institute ICP-ECOPETROL and Morrosquillo Institute Corporation.

*Thesis.

**Faculty of engineering physics chemistry. School of Chemical engineering. advisors: Ph.D. Viatcheslav Kafarov y M.Sc. Crisóstomo Barajas. Supervisor: B. Sc. Andrés Fernando Barajas.

INTRODUCCIÓN

La creciente preocupación medioambiental debido a los gases de efecto invernadero (GEI) que causan el calentamiento global, han llevado a un aumento en la demanda por combustibles alternativos y renovables. El CO₂ vertido a la atmósfera es considerado el principal GEI (Kondili and Kaldellis, 2007; Bilanovic et al., 2008; Chinnasamy et al., 2009) y se estima que sus emisiones anuales aumentaron un 80% entre 1970 y 2004, afectando la estabilidad económica, social y ambiental del planeta (Loera-Quesada and Olguín, 2010). Por ello su mitigación y utilización se ha estudiado de manera considerable (Jeong et al., 2003).

Las microalgas presentan ventajas tales como la alta tasa de crecimiento, alta eficiencia fotosintética y alta producción de biomasa comparada con otros cultivos terrestres energéticos (Hwan-Byung and Kim, 2009; Scarsella et al., 2009; Šoštariè et al., 2009). Enlazar este tipo de cultivos con la biofijación de dióxido de carbono, tiene el potencial, no sólo para reducir los costos en la obtención de productos de valor agregado (Biodiesel y otros) (Jeong et al., 2003; Morais and Costa, 2007; Crutzen et al., 2008), sino también la compensación de las emisiones de carbono (Beneman and Hughes, 1997).

El objetivo de este trabajo es realizar el estudio sobre la influencia de la inyección continua de CO₂ como fuente de carbono en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobioreactores a escala laboratorio, a diferentes concentraciones de NaNO₃ por debajo del estipulado por el medio de crecimiento Bold Basal, a las condiciones del laboratorio.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 GENERALIDADES

Las algas representan alrededor del 0,5% de la biomasa global. Sin embargo producen alrededor del 70% del oxígeno neto en la tierra. En el proceso, el CO₂ es fijado por medios fotosintéticos en grandes cantidades y la biomasa se enriquece en lípidos la cual puede ser usada para la producción de biodiesel (Hall, 2008). Las microalgas son un grupo de microorganismos unicelulares o multicelulares simples, como organismos fotosintéticos que necesitan la energía solar, el dióxido de carbono, agua y nutrientes. El suministro y el control eficiente de estos parámetros definen la producción final (Van Hermelen et al., 2006).

Las microalgas poseen una alta tasa de crecimiento, siendo entre 10 a 50 veces más eficientes en fijación de CO₂ que las plantas terrestres (Costa et al., 2000), además de requerir menor energía para la elaboración de biomasa (Bilanovic et al., 2008; Li et al., 2008).

En teoría, las microalgas pueden fijar cerca del 9% de la luz solar incidente y generar 280 toneladas de biomasa seca por ha⁻¹ y año⁻¹ y consumir alrededor de 513 toneladas de CO₂ (Bilanovic et al., 2008). Estas pueden fijar CO₂ del ambiente, hasta en lugares con concentraciones 1000 veces más altas que las ambientales, lo cual podría ser útil para controlar los altos niveles de CO₂ industriales (Papazi et al., 2008). Teniendo en cuenta un enfoque biológico, el CO₂ es convertido en productos de valor agregado tales como proteínas, vitaminas, alimento, combustibles entre otros (Jeong et al., 2003; de-Morais and Costa, 2007a). La fijación del CO₂ por medio de microalgas es ecológicamente sostenible cuando se combina con otros procesos de protección ambiental tales como el

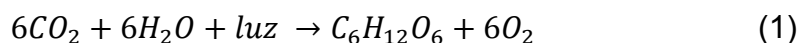
tratamiento de aguas residuales (Mallick, 2002) o la remoción de metales pesados (Jacome-Pilco et al., 2009).

1.1.1 *Chlorella vulgaris*.

Chlorella sp. posee un ciclo de vida simple. Esta puede crecer de forma fotoautotrófica usando como fuente de carbono el CO₂, o heterotrófica, en la cual la fuente de carbono es una sustancia orgánica (Richmond, 2004); *C. vulgaris* es un alga verde unicelular de 2 a 10 micras de diámetro, que puede dividirse en cuatro células cada 20 horas (Song et al., 2008) con un contenido de lípidos acumulados alrededor del 20% (Griffiths and Harrison, 2009); pertenece al Reino: *Protista*; División: *Chlorophyta*; Clase *Chlorophyceae*; Orden: *Chlorococcales*; Familia: *Oocystaceae*; Género: *Chlorella*; Especie: *vulgaris*.

1.2 FOTOSÍNTESIS Y RESPIRACIÓN

La fotosíntesis ha existido y ha formado parte del medio ambiente de la tierra por más de 3,5 billones de años, proporcionando la fundación de toda la vida aerobia (Raven, 1997). Una célula algal es construida generalmente por la conversión energética a través de la fotosíntesis, la cual proporciona una manera de convertir y almacenar la energía lumínica en energía química (Brennan and Owende, 2010). Este proceso convierte los compuestos de carbono inorgánico y la energía lumínica en compuestos orgánicos (Spolaore et al., 2006); es decir, la captura del dióxido de carbono, agua y luz para convertirlo en carbohidratos y oxígeno como lo muestra la reacción.



El proceso de la fotosíntesis está dividido en 2 fases, la *fase de luz* y la *fase oscura*. Empieza con la denominada *fase de luz*, cuando los fotones son captados por la clorofila, sustancia verde que se encuentra comúnmente como clorofila *a* o clorofila *b* en los cloroplastos (Patiño, 2007). La energía lumínica es convertida en energía química dando como productos NADPH₂ y ATP. NADPH₂ es un agente reductor bioquímico y el ATP es un compuesto altamente energético. En la fase oscura, el NADPH₂ y ATP son usados en la reducción del dióxido de carbono en carbohidratos (Brennan and Owende, 2010).

En la fotorespiración, el carbono orgánico es convertido en dióxido de carbono. La fotosíntesis y la fotorespiración ocurrirán dependiendo de la concentración relativa de oxígeno y de dióxido de carbono. La tasa de aireación del CO₂, la transferencia eficiente de masa del CO₂ junto con la intensidad de luz son los mayores factores en la asimilación fotosintética del carbono en plantas y en otros organismos fotosintéticos (Hodaifa et al., 2009; Jacob-Lopes et al., 2009b; Ryu et al., 2009). Pulz (2001) encontró que el balance entre CO₂/O₂ es también un factor primordial en el logro de una mayor tasa fotosintética; un exceso de oxígeno puede convertirse en un problema para el cultivo del alga, debido a que esto limita la tasa de fotosíntesis (fotorespiración) (Pulz, 2001; Richmond, 2004). Los cultivos fototróficos, por lo general, presentan dificultades para alcanzar tasas altas de crecimiento y productividad (Xiong, 2010).

1.3 REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO

El buen desempeño de una cepa de microalgas depende de muchos factores tales como la intensidad de la luz, concentración de CO₂, medio de cultivo, temperatura y el diseño del fotobioreactor (Ho et al., 2011).

1.3.1 Luz

En cultivos fotosintéticos, la disponibilidad lumínica es un factor que determina la productividad. De manera general, la cantidad de energía lumínica recibida, el periodo de exposición a la misma y la energía lumínica almacenada por las células tiene una relación directa con la productividad en la biomasa y la tasa de crecimiento (Jacob-Lopes et al., 2009b).

La cantidad de luz requerida para la fotosíntesis es aproximadamente de un quinto a una décima parte de la cantidad de luz disponible al medio día (Richmond, 2004). La tasa de crecimiento aumenta, de la misma manera que aumenta la irradiación de luz hasta una irradiación máxima, en la cual el crecimiento es inhibido, generando un fenómeno conocido como fotoinhibición (Lee and Pirt, 1984; Blanchemain and Grizeau, 1996; Molina Grima et al., 1996; Lee, 1999; Melis, 1999), esta es una de las mayores causas en la reducción de la productividad del alga (Eiichi et al., 2010).

A una mayor densidad celular en el cultivo, menor la cantidad de luz que puede penetrar al mismo. La zona donde la luz puede llegar y puede brindar soporte a la fotosíntesis es llamada la región iluminada y la zona donde la fotosíntesis no ocurre debido a la ausencia de luz es llamada la región oscura, dentro de un sistema de cultivo (Richmond, 2004).

Si el cultivo presenta una zona oscura, las células pueden estar expuestas a la sombra dentro del reactor, conllevando a que las microalgas experimenten ciclos de luz y oscuridad (en presencia de burbujeo/agitación). Estos ciclos pueden ser cortos, de milisegundos o pocos segundos, dependiendo de que tanto puede penetrar la luz al medio de cultivo y a la turbulencia del mismo. La cantidad de luz a la que está expuesta la microalga depende de la razón a la cual el alga está expuesta a los ciclos de luz y oscuridad y a la frecuencia del ciclo. Con una mayor

frecuencia del ciclo es posible usar la energía lumínica de manera más efectiva (Richmond, 2004).

1.3.2 Fuente de carbono

La fuente de carbono es el mayor contribuyente en la producción de biomasa para la microalga. El carbono puede ser agregado en compuestos orgánicos como la peptona o el ácido acético, o en compuestos inorgánicos como el dióxido de carbono (Richmond, 2004). Durante la fotosíntesis, las microalgas pueden fijar el dióxido de carbono de diferentes fuentes, incluida la atmósfera, gases industriales de chimenea y soluciones salinas de carbonato (NaHCO_3 and Na_2CO_3) (Šoštarić et al., 2009).

La fijación del CO_2 por parte de las microalgas implica un crecimiento fotoautotrófico de las células, la capacidad de fijación del CO_2 para algunas especies, puede estar relacionada con el crecimiento de las células y el adecuado aprovechamiento de la luz (Jacob-Lopes et al., 2009a,b). Además, la eficiencia de la fotosíntesis en microalgas decrece con un incremento de la temperatura, ya que la solubilidad del CO_2 decrece de manera significativa (Pulz, 2001).

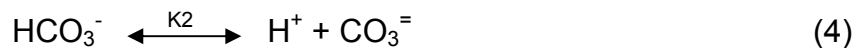
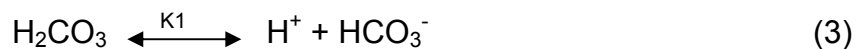
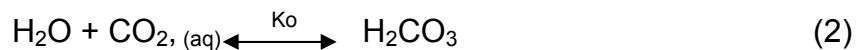
Entre los factores que afectan la eficiencia de la utilización del CO_2 y el crecimiento celular se encuentra la concentración de CO_2 , la tasa de aireación, el tamaño de burbuja y el tiempo de residencia de la burbuja (Hsueh et al., 2007; Zhang et al., 2002). En general, el obtener una amplia área de interface aire/líquido es el primer paso vital para aumentar la transferencia de masa del CO_2 (Carvalho and Malcata, 2001; Ryu et al., 2009). Sólo una baja fracción del dióxido de carbono inyectado se incorpora a la biomasa de las microalgas.

Utilizando únicamente el CO_2 presente en el aire (0,036%) se obtiene una baja productividad. Por lo tanto la solución a este déficit es mezclar CO_2 con aire en

bajas proporciones del total del flujo de gas para obtener un buen crecimiento (Lee and Pirt 1984; Merchuk et al., 2000; Morita et al., 2001; Babcock et al., 2002; Chiu et al., 2008).

La disolución del dióxido de carbono en el agua es compleja debido a las reacciones reversibles en fase líquida, las cuales generan 4 especies diferentes presentes en el medio; dióxido de carbono (CO_2), ácido carbónico (H_2CO_3), ion bicarbonato (HCO_3^-), y ion carbonato ($\text{CO}_3^{=}$), cuyas concentraciones en el equilibrio dependen del pH.

Para su disolución en agua, el CO_2 sufre tres reacciones químicas (Hill et al., 2001):



En las reacciones anteriores, las constantes de equilibrio (K_0 , K_1 , K_2) son funciones de la temperatura y de las concentraciones de las especies químicas. El valor de K_0 es tal que la concentración de CO_2 disuelto excede por mucho la de H_2CO_3 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 CO_2 disuelto y el H_2CO_3 en especies neutras son considerados como un solo componente y llamado ácido carbónico, H_2CO_3 .

La habilidad de la *C. vulgaris* de crecer en altas concentraciones de dióxido de carbono ha sido demostrada en múltiples estudios (Je-Keffler, 2002; Yoo et al., 2010). Ha sido mostrado que *C. vulgaris* es un organismo muy efectivo para la fijación del CO_2 en comparación con otros tipos de alga del mismo género (Yun et al., 1997; Chisti, 2008). El género *Chlorella* presenta un mayor contenido lipídico

en un rango de 2-5% de CO₂. Por otra parte, *C. vulgaris* presenta una mayor fijación de CO₂ a concentraciones de 1% CO₂ (Lv et al., 2010).

Fue encontrado que a las condiciones de pH 5,7 y 243 ppm de CO₂, el medio del alga contiene $4,61 \times 10^{-3} \text{M}$ de CO₂ acuoso (H₂CO₃) y $8,92 \times 10^{-4} \text{M}$ del ion bicarbonato (HCO₃⁻). Esto indica que *C. vulgaris* utiliza el CO₂ acuoso (en un 80%) y el ion bicarbonato acuoso (en un 20%) para la fijación biológica del CO₂ (Jeong et al., 2003).

1.3.3 Medio de cultivo

Como cualquier otro organismo vivo, el alga necesita de nutrientes para su sostenibilidad, crecimiento y prosperidad. Estos nutrientes son similares a los que las plantas requieren y consisten principalmente en nitrógeno, fosforo, potasio y trazas de hierro y otros metales (Zame, 2010). Los nutrientes son suministrados por un medio de cultivo. Diversos medios para el cultivo de microalgas se han propuesto y muchos de estos se han derivado del análisis químico a sus hábitats naturales (Vonshak, 1986).

Después de la fuente de carbono, el nitrógeno es el segundo nutriente más importante para la producción de biomasa por parte del alga. Alrededor del 10% de la biomasa puede consistir en nitrógeno. La forma más común de agregar el nitrógeno al medio es en forma de nitrato (NO₃⁻) (Richmond, 2004).

Se observó que la limitación de nitrógeno da lugar a un incremento del contenido de lípidos en algunas cepas de *Chlorella* sp. (Reitan et al., 1994). La deficiencia de nitrógeno conduce a una caída del contenido de este nutriente en el peso seco del 8 % al 2 % y una reducción en el contenido de clorofila. Además, los productos de la fotosíntesis cambian de proteínas a carbohidratos y lípidos (Syrett, 1962; Reitan et al., 1994; Li et al., 2008; Rodolfi et al., 2009).

Muchos otros nutrientes como S, K, Na, Fe, Mg, Ca, P y trazas de elementos tales como B, Cu, Mn, y Mo también son importantes siendo usados en las reacciones enzimáticas (Richmond, 2004). En la preparación del medio de crecimiento a nivel de laboratorio se usa agua destilada, agua filtrada o desionizada. Sin embargo, para los cultivos a gran escala se hace uso de agua domestica o proveniente de alguna fuente hídrica (Richmond, 2004).

1.3.4 Temperatura

Diferentes algas poseen diferentes temperaturas óptimas de crecimiento. *C. vulgaris* tiene un descenso en la tasa de crecimiento si la temperatura del medio está por encima de los 25 °C. Esta continúa creciendo a temperaturas por encima de por lo menos 40 °C. Pero la tasa de crecimiento es menor comparada con la registrada a 25°C (Edberg, 2010).

1.3.5 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 (CO₂, 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); Según lo demostrado por Hill et al., (2001), aunque se inyecte grandes cantidades de CO₂, el pH del medio llega a un equilibrio debido al consumo del CO₂ por parte de las microalgas y por la presencia de nitratos en el medio.

El pH en el medio de cultivo afecta el crecimiento de la *C. vulgaris*. A un pH 4 o menor el alga no crece. El crecimiento es más rápido a un pH de 6 que a un pH de 8, pero después de 18 días la misma concentración de biomasa se lograra en ambos casos. Entre pH 10 y 12 el crecimiento será menor con respecto al

crecimiento en pH 8. La literatura recomienda que el cultivo contenga un pH de aproximadamente 6 (Lustigman, 1994; Edberg, 2010).

1.4 SISTEMAS DE CULTIVO

Las algas pueden ser cultivadas en sistemas abiertos o en sistemas cerrados. Los sistemas abiertos pueden ser sistemas naturales como lagos, lagunas, y sistemas artificiales como piscinas o contenedores. Los sistemas abiertos son más fáciles de construir y de operar que los sistemas cerrados. Las limitaciones en las piscinas abiertas incluyen poco aprovechamiento de la luz por las células del alga, pérdidas de agua por evaporación, difusión del CO₂ a la atmósfera y el requerimiento de grandes áreas terrestres. Otros problemas incluyen la contaminación de las piscinas por microorganismos y otros heterótrofos de rápido crecimiento. Fotobioreactores cerrados han tomado mayor interés por que permiten un mejor control en la captura del CO₂ y producción de biomasa (Ugwu et al., 2008).

Los fotobioreactores de columna vertical son aireados desde el fondo y son iluminados a través de las paredes transparentes. Este tipo de bioreactores son efectivos cuando se trata de mezclar el cultivo; tienen la mayor tasa de transferencia volumétrica y son los que poseen un mayor control en las condiciones del cultivo (Brennan and Owende, 2010). Por esto son tomados con mayor interés ya que poseen un mejor control en la captura del CO₂ y producción de biomasa (Ugwu et al., 2008).

1.5 CONCEPTOS DE ANÁLISIS BIOTECNOLÓGICOS.

La máxima concentración de biomasa alcanzada en un fotobioreactor es designada como X_{\max} (g L^{-1}). La productividad (P , $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) fue obtenida usando la ecuación $P = (X_t - X_0) / (t - t_0)$ (5) donde X_t es la concentración de biomasa (g L^{-1}) en el tiempo $t(\text{d})$ y X_0 es la concentración de biomasa en el inoculo a t_0 . (Schmidell et al., 2001). La máxima productividad durante un cultivo es designada como P_{\max} ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$).

La relación entre la densidad óptica y la cantidad de biomasa está dada por la ley de Beer-Lambert:

$$Abs = K * X * L \quad (6)$$

Donde, Abs es la absorbancia, K es el Coeficiente másico de extinción X la concentración y L el espesor de la cubeta (Franco-Lara et al., 2006).

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La experimentación se realizó en 3 fases. Las 2 primeras fases contaron con un (%v/v) de CO₂, diferente para cada caso, una concentración inicial de biomasa (0,6; g L⁻¹) y cuatro diferentes concentraciones de nitrato de sodio. Estas dos últimas condiciones se mantuvieron constantes. Una tercera fase fue la realización del mismo sistema pero solo con el valor medio de las concentraciones iniciales de nitrato las cuales obtuvieron las mayores productividades. Cada cultivo estuvo sometido a ciclos de 12:12 horas de luz/oscuridad y a una temperatura de 23±1°C. La inyección continua de CO₂ fue proporcionada por una bala de CO₂ (Praxair Oxígenos de Colombia-20 Kg) y fue controlada por medio de un rotámetro durante el tiempo de luz. La luz fue suministrada por fluorescentes dispuestos de tal manera que la intensidad lumínica fuera constante para cada cultivo. Para cada condición, se contó con 3 replicas y tuvo una duración de 5 días.

2.1 MÉTODOS DE CULTIVO

La microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, fue adquirida de la colección de cepas proveniente de la Universidad de Texas (Austin, Tex, USA). Esta se cultivó en Medio Bold Basal modificado (MBBM), de acuerdo con (Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, UK)(Anexo 2). La solución de Cada cultivo se desarrolló en medio compuesto por (mg L⁻¹): MgSO₄·7H₂O (75); NaCl (25); K₂HPO₄ (75), KH₂PO₄ (175); CaCl₂·2H₂O (25); ZnSO₄·7H₂O (8,82); MnCl₂·4H₂O (1,44); MoO₃ (0,71); CuSO₄·5H₂O (1,57); Co(NO₃)₂·6H₂O (0,49); H₃BO₃ (11,42); EDTA (50); KOH (31); FeSO₄·7H₂O (4,98); 0,001mL H₂SO₄(conc), y utilizando diferentes concentraciones de NaNO₃ como fuente de nitrógeno por debajo del estándar.

2.2 FOTOBIOREACTORES

Se usaron botellas plásticas transparentes de 2½ litros (L) con diámetro interno de 14cm y 35cm altura con un volumen del cultivo de 2 L. Los reactores se acoplaron a un sistema de aireación por burbujeo (tubo-difusor) para la inyección de aire y CO₂. Con este sistema se buscó mejorar la homogeneidad de todo el cultivo.

Figura 1. Montaje de laboratorio.



Fuente: Autores

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.

2.3.1 Concentración de Biomasa

Para las mediciones de concentración de biomasa, se tomó una muestra de 6 ml de cada cultivo. Posteriormente se diluyó a una relación muestra / agua destilada de 1:8. Luego se utilizó un espectrofotómetro (Spectroquant® Pharo 300, rango de longitud de onda de 190-1100nm) con el cual se midió la densidad óptica de cada muestra a una longitud de onda de 500nm (estos valores se estuvieron entre 0,1 –

0,9). La densidad óptica (D.O) fue correlacionada con la cantidad de biomasa (g L-1) de acuerdo a:

$$C_B = 1,4602 * DO_{500} \quad (7)$$

2.3.2 Concentración de Clorofila total

Se tomó 10 ml de muestra de cada fotobioreactor, se centrifugó a 3400 rpm durante 7 minutos (Centrifuga PowerSpin™ MX, velocidad variable 1000 a 3400 rpm, rotor para 24 tobos de 2 a 10 ml). Luego se extrajo el sobrenadante con el fin de eliminar el medio presente. El pellet (biomasa resultante) fue resuspendido en 3 ml de etanol al 99%. La mezcla se llevó a calentamiento en baño maría durante 5 minutos. Luego de un posterior enfriamiento se agregó 2 ml adicionales de etanol y se centrifugó por 1 minuto a 2000 rpm. La concentración de clorofila en el sobrenadante se calculó leyendo la absorbancia (A) del pigmento en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 y 665 nm. La relación de la cantidad de clorofila (a+b) en el sobrenadante C_{a+b} (mg/L) con la densidad óptica fue correlacionada de acuerdo a la ecuación de Becker, (1994).

$$\text{Clorofila } (a + b) = (4 * A_{665}) + (25,5 * A_{650}) \quad (8)$$

2.3.3 Otros métodos

Para realizar un control del desempeño de cada uno de los fotobiorreactores, el pH se midió en el momento de la extracción de las muestras. Esto se hizo por medio de un medidor de pH (PH- METRO Handylab pH 11 SCHOTT Instruments).

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

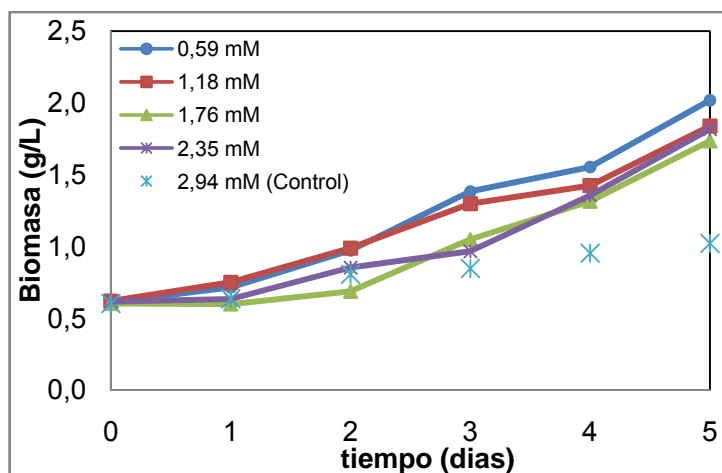
Se estudió la influencia del % de carbono y concentración de nitrógeno, involucrados en la productividad de biomasa y cantidad de clorofila (a+b) de *C. vulgaris* en cultivos Autotróficos, mediante el análisis de 2 diseños factoriales de 2 factores utilizando el *software* Demo-MINITAB. Los factores a estudiar son: %CO₂ con 2 niveles (2,3%; 3,8%) y concentración de NaNO₃ con 4 niveles (0,59mM; 1,18mM; 1,77mM; 2,35mM).

3. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.

Teniendo en cuenta las fases mencionadas anteriormente se obtuvieron los siguientes resultados.

A partir de la figura 2 se puede inferir que la mayor cantidad de biomasa obtenida fue de 1,416 (g L⁻¹), por el cultivo que contenía una concentración inicial de 0,59 mM de NaNO₃ debido a que este cultivo comenzó su crecimiento exponencial desde el día 0 sin presentar una fase de adaptación. Esto se debe a la escases de nitrógeno, lo cual obliga a la microalga a consumir rápidamente el carbono presente en el medio (2,3% CO₂).

Figura 2. Concentración de biomasa (g L⁻¹) obtenida a partir de (Aire+2,3%CO₂).



Fuente: los autores.

Cultivos con 0,59 y 1,18mM de NaNO₃ tuvieron un comportamiento similar, aunque sus μ_{MAX} en la fase exponencial fueron diferentes (tabla 1). Según Fan et., al (2008) a un cambio en las condiciones del cultivo la microalga presentara una

fase de adaptación por un cierto tiempo y seguidamente entrara a la fase de crecimiento. Los cultivos con 1,76 y 2,35mM presentaron una fase de adaptación hasta el día 2 y 3 respectivamente en donde comenzaron la fase de crecimiento exponencial, con mayores μ_{MAX} y así obtuvieron cantidades finales de biomasa similares al cultivo con 1,18mM al día 5 como se muestra en la figura 2.

Tabla 1. Velocidades máximas específicas de crecimiento (μ_{MAX}) fase 1.

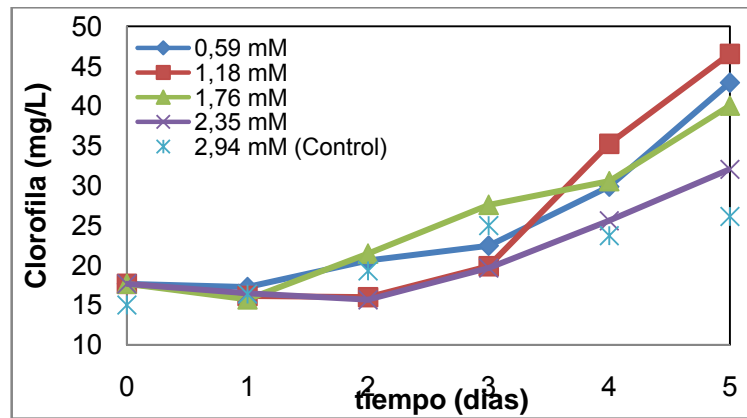
Concentración de nitrógeno NaNO ₃ (mM)	μ_{MAX} (d ⁻¹)
0,59	0,2471
1,18	0,2179
1,76	0,3002
2,35	0,3154

Fuente: los autores.

A partir de la figura 3, se puede analizar que los cultivos tuvieron una fase de adaptación dentro del medio, siendo más largo para los cultivos con concentraciones iniciales de 1,18mM y 2,35mM de NaNO₃. Sin embargo todos los cultivos tienden a aumentar su cantidad de clorofila hasta el día 5 y esto es debido a que en el medio hay suficiente nitrógeno para suplir las necesidades del alga. La mayor producción de clorofila para la fase 1 se alcanzó en el cultivo con una concentración inicial de nitrógeno de 1,18mM; a pesar que la fase de adaptación llegó hasta el día 3, su tasa de producción de este pigmento fue mayor con respecto a los otros cultivos.

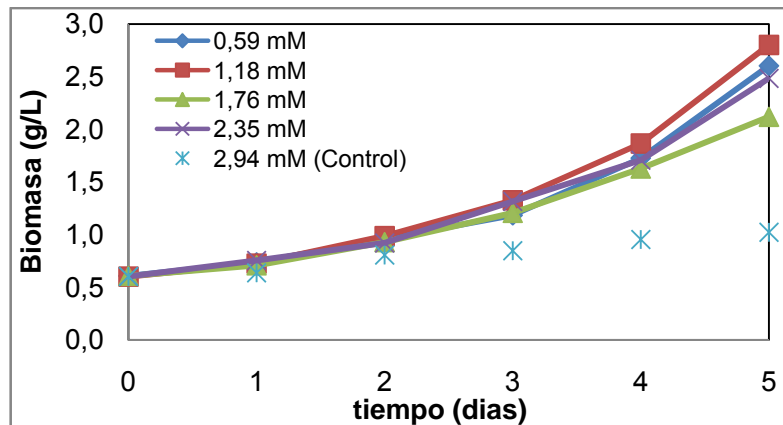
A partir de la grafica 4 se puede inferir que durante los 5 días las tasas de crecimiento fueron mayores que en la fase 1, debido al aumento en el %CO₂ suministrado. Se realizó un análisis de la cinética para estos cultivos y se obtuvo que el mayor μ_{MAX} fue para el de una concentración inicial de 1,18mM de NaNO₃ como se puede observar en la tabla 2, generando una cantidad de biomasa de 2,199(g L⁻¹). Cada cultivo tuvo un determinado día donde su crecimiento comenzó a ser exponencial, siendo un factor en la producción final de cada cultivo.

Figura 3. Concentración de clorofila (mg L^{-1}) obtenida a partir de (Aire- $2,3\%\text{CO}_2$).



Fuente: los autores

Figura 4. Concentración de biomasa (g L^{-1}) obtenida a partir de (Aire+ $3,8\%\text{CO}_2$).



Fuente: los autores.

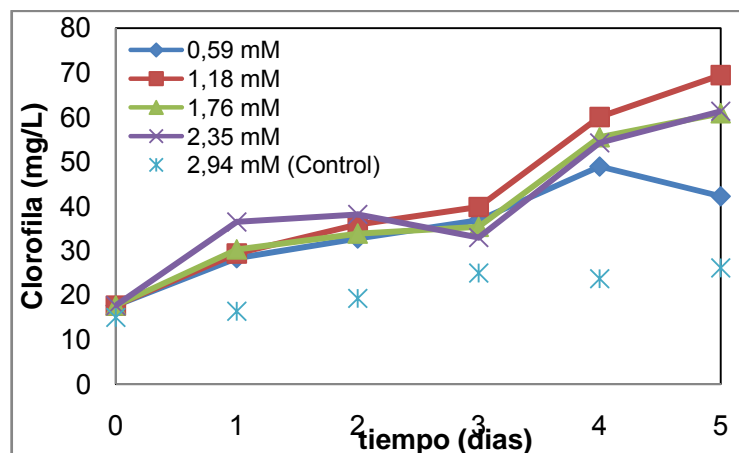
Tabla 2. Velocidades máximas específicas de crecimiento (μ_{MAX}) fase 2

Concentración de nitrógeno NaNO_3 (mM)	μ_{MAX} (d^{-1})
0,59	0,3342
1,18	0,394
1,76	0,2755
2,35	0,3239

Fuente: los autores.

La figura 5 permite deducir que todos los cultivos tuvieron una fase de bajo crecimiento hasta el día 3. Esto se pudo deber al aumento en la cantidad de CO₂ suministrado, el cual permite que el alga aumente su tasa fotosintética. Sin embargo, el alga necesita estabilizarse a sus nuevas condiciones para que su metabolismo funciones correctamente. Después del día 3 todos los cultivos realizaron un aumento en sus tasas fotosintéticas de este pigmento con respecto a los días anteriores, indicando la adaptación a las condiciones para esta fase. El cultivo con una concentración inicial de nitrógeno de 0,59mM presenta una caída en su concentración de clorofila. Esto me indica que al día 4 para este cultivo, los requerimientos de nitrógeno por parte del alga no son encontrados en el medio, llevando al alga a utilizar sus reservas internas de nitrógeno, representadas en la clorofila.

Figura 5. Concentración de clorofila (mg L⁻¹) obtenida a partir de (Aire+3,8%CO₂).

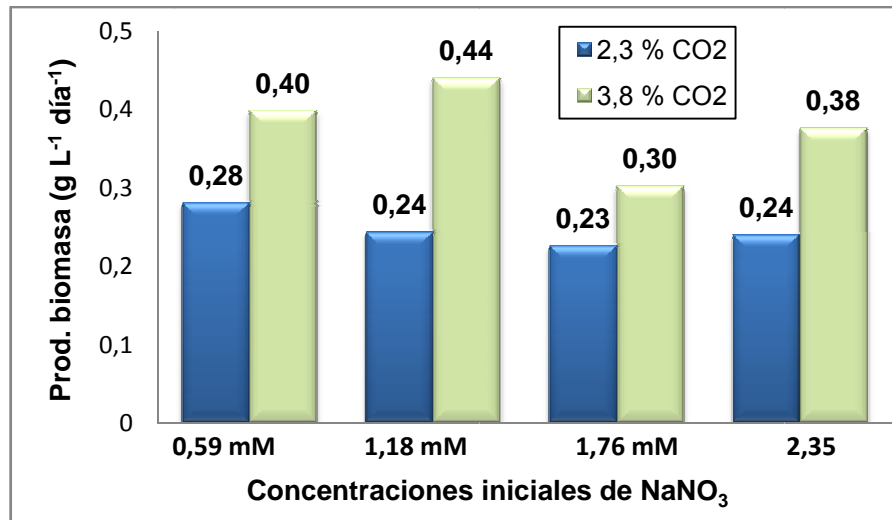


Fuente: los autores

La figura 6 permite ver claramente que a un aumento en la cantidad de CO₂, aumenta su productividad. Esto confirma el hecho de que al aumentar la concentración de CO₂ presente en el medio, se obtiene una mayor cantidad de biomasa con las mismas concentraciones de nitrógeno y en el mismo tiempo. Esto indica que la concentración de carbono es una de las principales variables en el

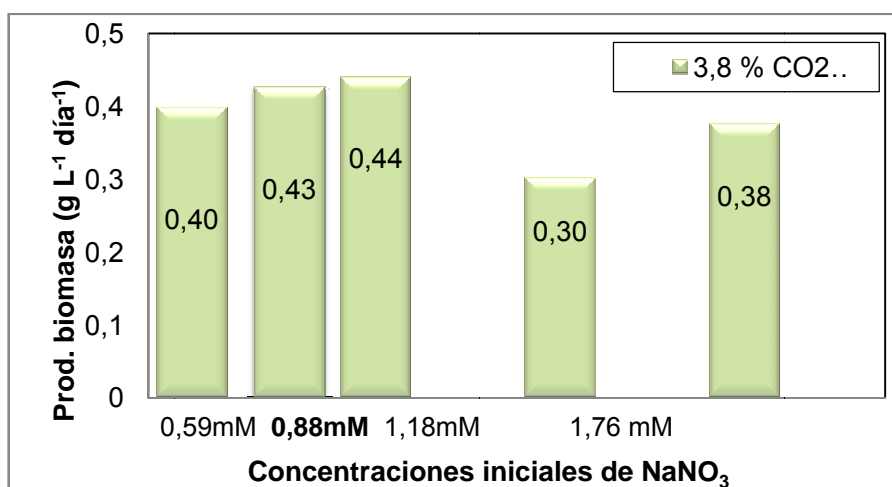
crecimiento de la microalga. El nitrógeno es otro factor importante en el crecimiento del alga pues, este nutriente permite la producción de compuestos nitrogenados como pigmentos fotosintéticos y proteínas.

Figura 6. Producción de biomasa a diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno



Fuente: los autores

Figura 7. Producción de biomasa a diferentes concentraciones nitrógeno a 3,8%CO₂.



Fuente: los autores

A partir del experimento adicional (fase 3), llevado a cabo con una concentración de 0,88 mM de NaNO_3 , con una productividad de $0,43 \text{ (g L}^{-1} \text{ día}^{-1}\text{)}$ y utilizado como anexo en la figura 7, se puede inferir que no existe un máximo local en el intervalo de concentración de 0,59 – 1,18mM de NaNO_3 con un flujo de 3,8% CO_2 , por el contrario se obtiene una productividad de $\pm 0,42 \text{ (g L}^{-1} \text{ día}^{-1}\text{)}$.

3.1 ANALISIS ESTADISTICO

Se realizaron 2 diseños factoriales de 2 factores, con un total de 24 observaciones, con el fin de analizar el efecto que tienen los factores % CO_2 , concentración de NaNO_3 y su interacción en las variables de respuesta Productividad (P_{max}) y Clorofila (a+b) ($C_{\text{a+b}}$).

3.1.1 Diseño factorial variable de respuesta P_{max} .

Primero se analizó la influencia de los 2 factores en cada uno de los valores de productividad máxima (P_{max}) de biomasa de *C. vulgaris* (tabla 4).

Se aplicó una serie de pruebas de normalidad y un test de homogeneidad de varianzas del efecto carbono/nitrato sobre la productividad para evaluar la normalidad del conjunto de datos a analizar. Los métodos empleados por el *software Minitab* incluyen pruebas como Kolmogorov-Smirnov, Ryan-Joner y pruebas de Bartlett y Levene (ANEXO 6). De este análisis se concluyó que se cuenta con una distribución de datos normalizados y homogeneidad en las varianzas, ya que a valores $p > 0,05$ no hay evidencias significativas de rechazar lo anterior.

Tabla 3. Factores y niveles para variable de respuesta Productividad.

Modelo lineal general: Pmax vs. NO ₃ (mM). CO ₂ (%)			
Factor	Tipo	Niveles	Valores
NaNO ₃ (mM)	fijo	4	0,59. 1,18. 1,76. 2,35
CO ₂ (%)	fijo	2	0,023. 0,038

Fuente: Demo-Minitab

Tabla 4. Disposición general para el diseño bifactorial en la variable de respuesta Productividad (g L⁻¹ día⁻¹).

Concentración inicial NaNO ₃ (mM)	%CO ₂	
	2,3	3,8
0,59	0,280	0,397
	0,256	0,345
	0,307	0,455
1,18	0,246	0,472
	0,299	0,408
	0,192	0,441
1,76	0,229	0,292
	0,224	0,293
	0,232	0,315
2,35	0,270	0,454
	0,211	0,316
	0,242	0,352

Fuente: autores.

Teniendo en cuenta el análisis de la tabla 5, Se concluye que la variación tanto del %CO₂, como la variación en la concentración de NaNO₃ son efectos significativos en la P_{max} obtenida en un cultivo de *C. vulgaris*. Esto debido a que en el análisis de varianza (ANOVA) se obtienen valores $p < 0,05$, indicando evidencia significativa de ello. Por otro lado, se puede decir que el efecto de interacción entre los 2 factores no es significativo.

Tabla 5. Análisis de varianza para P_{max} .

Análisis de varianza para Pmax, utilizando SC ajustada para pruebas						
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
	3	0,024202	0,024202	0,008067	4,69	0,016
NaNO ₃ (mM)	1	0,100325	0,100325	0,100325	58,37	0,000
CO ₂ (%)	3	0,011563	0,011563	0,003854	2,24	0,123
NaNO ₃ (mM)*CO ₂ (%)	16	0,027498	0,027498	0,001719		
Error						
S = 0,0414565 R-cuad. = 83,19% R-cuad.(ajustado) = 75,84%						

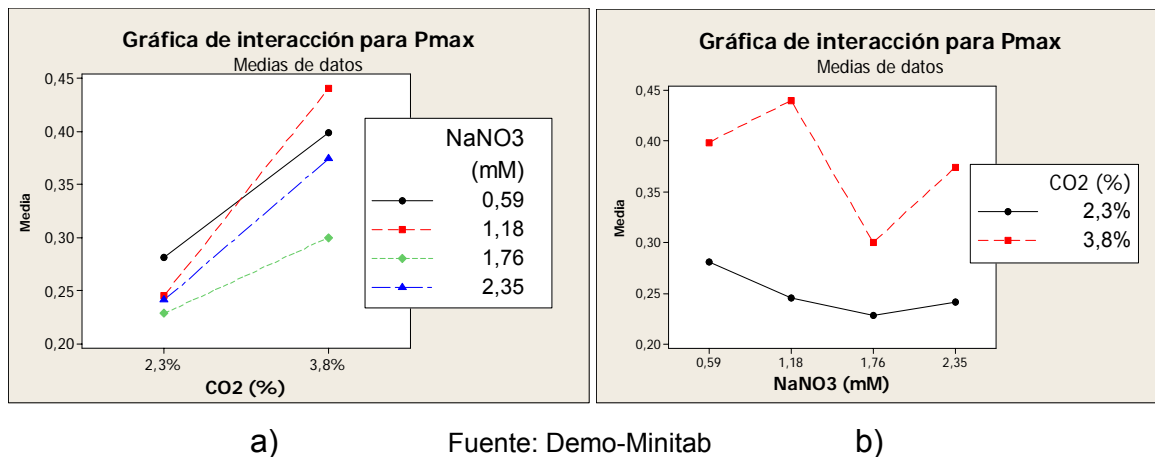
Fuente: Demo-Minitab.

Como auxiliar en la interpretación de los resultados de este experimento resulta útil la construcción de gráficas de respuesta promedio de cada combinación de tratamiento. Esto se muestra en la figura 8.

Teniendo en cuenta la respuesta promedio del %CO₂ en P_{max} (figura 8a), vemos que a un mayor valor de %CO₂ obtenemos una mayor P_{max} . A las concentraciones 1,78 - 2,35mM solo hay un incremento en la magnitud al pasar de 2,3 a 3,8% CO₂, mientras que a concentraciones de 0,59 – 1,18mM vemos una diferencia en la dirección de la respuesta. Es decir, no todas las productividades crecen al aumentar la cantidad de CO₂ presente en el medio.

Observando la figura 8b, podemos resaltar de forma general el incremento en el P_{max} en presencia de un flujo 3,8%CO₂ a cualquier concentración de NaNO₃ comparada con uno a 2,3% CO₂.

Figura 8. Respuesta promedio de cada combinación.



3.1.2 Diseño factorial variable de respuesta C_{a+b} .

Se analizó la influencia de los 2 factores en cada uno de los valores de cantidad de Clorofila (a+b) (C_{a+b}) final obtenidos (ANEXO 6, Tabla 6-A6).

Con el análisis de variancia (ANOVA) aparece en la tabla 7, se concluye que tanto el % de CO_2 , como la concentración de $NaNO_3$ son efectos significativos en la cantidad de C_{a+b} obtenida en un cultivo de *C. vulgaris*. Esto debido a que valores $p < 0,05$ indican evidencia significativa de ello. De la misma manera, se puede decir que el efecto de interacción entre los 2 factores es significativo.

Tabla 7. Factores y niveles para variable de respuesta $C_{(a+b)}$.

Modelo lineal general: Clorofila vs. CO_2 (%). $NaNO_3$ (mM)			
Factor	Tipo	Niveles	Valores
CO_2 (%)	fijo	2	0,023. 0,038
$NaNO_3$ (mM)	fijo	4	0,59. 1,18. 1,76. 2,35

Fuente: Demo-Minitab

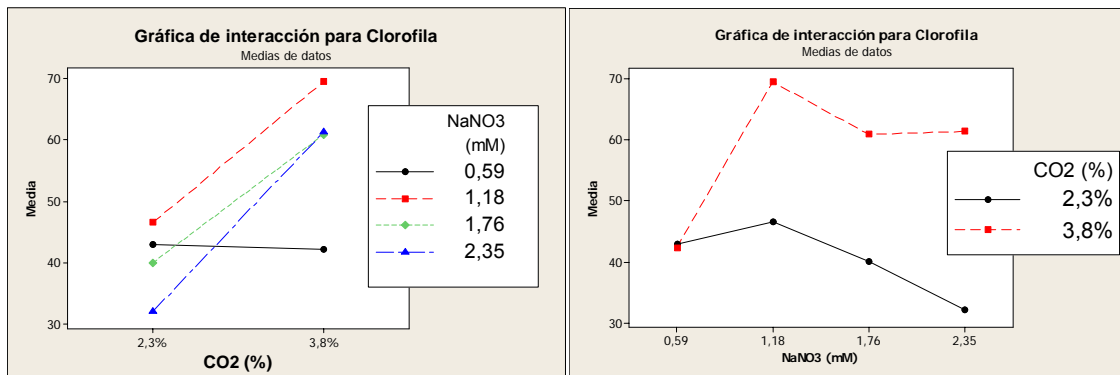
Como auxiliar en la interpretación de los resultados de este experimento resulta útil la construcción de una gráfica de respuestas promedio de cada combinación de tratamiento.

Tabla 8. Análisis de varianza para $C_{(a+b)}$.

Análisis de varianza para Clorofila, utilizando SC ajustada para pruebas						
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
CO2 (%)	1	1961,54	1961,54	1961,54	34,72	0,000
NaNO ₃ (mM)	3	774,03	774,03	258,01	4,57	0,017
CO2 (%)*NaNO ₃ (mM)	3	763,26	763,26	254,42	4,5	0,018
Error	16	903,94	903,94	56,5		
Total	23	4402,77				
S = 7,51641 R-cuad. = 79,47% R-cuad.(ajustado) = 70,49%						

Fuente: Demo-Minitab

Figura 9. Respuesta promedio de cada combinación para datos $C_{(a+b)}$.



a)

Fuente: Demo-Minitab

b)

A partir de la grafica 9a, podemos deducir que el aumento a 3,8% CO₂ tuvo una mayor influencia en el aumento de la cantidad de clorofila, a excepción de la presentada a una concentración de 0,59 mM de NaNO₃, donde se observó un decrecimiento en la cantidad de clorofila y su valor final tuvo un valor similar al reportado con 2,3%CO₂. Además, observando la grafica 9b, se puede inferir que dentro del intervalo de concentraciones 1,18 – 1,76mM, la influencia de la concentración de NaNO₃ no es muy significativa, ya que la pendientes en ese intervalo son similares.

CONCLUSIONES

La cantidad de carbono suministrado, representado por el CO_2 genera una mayor influencia en comparación con la concentración de clorofila en el crecimiento de *C. vulgaris* a escala de laboratorio a las condiciones establecidas.

El contenido de clorofila en un cultivo, creció de manera estable a bajas concentraciones de CO_2 , ya que el tiempo de adaptación tiende a ser menor.

Para las concentraciones de CO_2 suministrado en el medio, se encontró que las mejores productividades están en los cultivos con concentraciones iniciales de NaNO_3 de 0,59 y 1,18mM.

A un 3,8 % CO_2 y 0,59mM de NaNO_3 se observa un decrecimiento en el contenido de clorofila indicando un déficit de nitrógeno tendiendo una mayor capacidad de carga lipídica en la biomasa

RECOMENDACIONES

Con base a los resultados obtenidos, se sugiere trabajar dentro del intervalo de 0,59 mM y 1,18mM conservando las condiciones establecidas en el cultivo.

Para posteriores estudios, se recomienda determinar la calidad y el contenido lipídico en las células de *C. vulgaris* a las condiciones previamente establecidas, ya que estas han sido consideradas como prometedoras candidatas para la producción de lípidos.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

Becker E.W., (1994). *Microalgae, Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, New York. Pág. 58-59.

Beneman J.R., Hughes E., (1997). Biological fossil CO₂ mitigation. *Energy Convers. Manage.* 38, S467–S473.

Blanchemain A., Grizeau D., (1996). Eicosapentaenoic acid content of *Skeletonema costatum* as a function of growth and irradiance; relation with chlorophyll a content and photosynthetic capacity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 196, 177–188.

Brennan L., Owende P., (2010). Biofuels from microalgae--A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 14(2): p. 557-577.

Bilanovic D., Andargatchew A., Kroeger T., Shelef G., (2008). Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N Concentrations – Response surface methodology analysis. *Energy Conservation and Management* 50: 262-267.

Carvalho AP., Malcata FX., (2001). Transfer of carbon dioxide within cultures of microalgae: plain bubbling versus hollow-fiber modules. *Biotechnol Prog*; 17: 265–72.

Chapoy A., Mohammadi A.H., Chareton A., Tohidi B., Richon D., (2004). Measurement and Modeling of Gas Solubility and Literature Review of the Properties for the Carbon Dioxide Water System *Ind. Eng. Chem. Res.* Vol 43, No 7, 1794-1802.

Chiu S.Y., Kao C.Y., Chen C.H., Kuan T.C., Ong S.C., Lin C.S., (2008). Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. In a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology* 99, 3389–3396.

Costa JAV., Linde GA., Atala DIP., (2000). Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World J. Microbiol Biotechnol* 2000; 16: 15–8.

Crutzen P.J., Mosier A.R., Smith K.A., Winiwarter W., (2008). N₂O release from agrobiomass production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. *Atmos. Chem. Phys.* 8, 389–395.

Chinnasamy S., Ramakrishnan B., Bhatnagar A., Das K.C., (2009). Biomass production potential of a Wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature. *Int. J. Mol. Sci* 10: 518-532.

Chisti Y., (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology.* 26(3): 126-131.

Carroll J.J., Slupsky J.D., Mather A.E., (1991). The solubility of carbon dioxide in water at low temperature. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, Vol. 20, No6, 1201- 1209.

Delente J., Behrens P.W., Hoeksema S.D., (1992). Closed photobioreactor and method of use. U.S. Patent 5,151,347.

Demirbas A., and Kara H., (2006). New Options for conversion of Vegetable Oils to Alternative Fuels. Energy Sources. Recovery, Utilization and Environmental Effects 28: 619-626.

Dodds W.S., Stutzman L.F., Sollam B.J., (1956). Carbon dioxide solubility in water. Industrial and engineering chemistry, Vol.1, No.1, 92 – 95.

Duan Z., and Sun R., (2003). An improved model calculating CO₂ solubility in pure water and aqueous NaCl solutions from 273 to 533 K and from 0 to 2000 bar, Chemical Geology 193 257–271.

E.B. Sydney et al., (2010). Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. Bioresource Technology 101 () 5892–5896

Edberg Ann., (2010). Growth of *Chlorella Vulgaris* at high carbon dioxide levels in Swedish light conditions, Laboratory testing and development of method. Master of Science Thesis in energy. Umeå. Institute of Technology. 45p.

Eiichi O., Joel L., Cuello, (2010). Selection of optimal microalgae species for CO₂ sequestration. [Cited March 2010]. Available from: <http://www.netl.doe.gov/publications/proceedings/03/carbon-seq/PDFs/158.pdf>.

Franco-Lara E.H., Peterat J., Weuster-Botz F.D., (2006). Model-Supported Optimization of Phototrophic Growth in a Stirred-Tank Photobioreactor. Biotechn Bioeng. Vol. 95, No. 6, 1177-1187.

Griffiths M.J., Harrison S.T.L., (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21, 493–507.

Gonzalez-Cabeza C.A., (2010). Mejoramiento de la tasa de producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* utilizando ciclos de luz artificial y diferentes fuentes de carbono a escala de laboratorio. Trabajo de Grado, Ing Química. Bucaramanga, Universidad Industrial de Santander, 61p.

Gutierrez R., Gutierrez-Sanchez R., Nafidi A., (2008). Trend analysis using nonhomogeneous stochastic diffusion processes. Emission of CO₂; Kyoto protocol in Spain. *Stoch. Environ. Res. Risk Assess* 22: 57-66.

Hall J., (2008). Earthworks & Systems: the most important organism? *Ecology Global Network* [Internet]. [cited March 2010]. Available from: <http://www.ecology.29.com/dr-jacks-natural-world/most-importantorganism/index.html>.

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.

Ho S.H., Chen C.Y., Lee D.J., Chang J.S., (2011). Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems — A review *Biotechnology Advances* 29. 189–198.

Hodaifa G., Martinez ME., Sanchez S., (2009). Daily doses of light in relation to the growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater. *J Chem Technol Biotechnol*;84:1550–8.

Huppe H.C., and Turpin D.H., (1994). Integration of Carbon and Nitrogen Metabolism in Plant and Algal Cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 45: 577-607.

Hsueh HT., Chu H., Yu ST., (2007) A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot spring and marine algae. *Chemosphere*; 66:878–86.

Huntley M., Redalje D., (2006). CO₂ Mitigation and Renewable Oil from Photosynthetic Microbes: A New Appraisal. Report, University of Hawaii, University of Mississippi. *Mitigation and Adaption Strategies for Global Change. United States.*

Hwan-Um B., Kim Y.S., (2009). Review: A change for Korea to advance algal-biodiesel technology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 156: 1-7.

Jacob-Lopes E., Revah S., Hernandez S., Shirai K., Franco TT., (2009a). Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors. *Chem Eng J* 2009a; 153: 120–6.

Jacob-Lopes E., Scoparo C.H.G., Franco T.T., (2007). Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica N"ageli* in tubular photobioreactors, *Chem. Eng. Process.*, doi:10.1016/j.cep.2007.06.004.

Jacob-Lopes E., Scoparo C.H.G., Lacerda L., Franco TT., (2009b). Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chem Eng Process* 2009b; 48: 306–10.

Jacome-Pilco C.R., Cristiani-Urbina E., Flores-Cotera L.B, Velasco-Garcia R, Ponce-Noyola T., Canizares-Villanueva RO., (2009). Continuous Cr(VI) removal by

Scenedesmus incrassatulus in an airlift photobioreactor. *Bioresour Technol* 2009;100: 2388–91.

JE-Keffer G.K., (2002). Use of *Chlorella vulgaris* for CO₂ mitigation in a photobioreactor *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002. 29.

Jeong M.L., Gillis, J.M.; Hwang, J.Y., (2003). Carbon Dioxide Mitigation by Microalgal Photosynthesis, *ull. Korean Chem. Soc. Vol. 24, No. 12* 1763.

Kondili E., Kaldellis J.K., (2007). Biofuel implementation in East Europe: Current status and future prospects. *Renew. Sust. Energ. Rev* 11: 2137-2151.

Juhasz A.L., Naidu R., (2000), Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene, *Int. Biodeter. Biodeg.*, 45, 57–88.

Lee C., (1999). Calculation of Light Penetration Depth in Photobioreactors. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 4, 78-81.

Lee B.D., Apel W.A., Walton M.R., (2006). Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807, *Bioresour. Technol.* 97 2427–2434.

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, Y.Q, Horsman M., Wu N., Lan C.Q., (2008a). Biofuels from Microalgae. *Biotechnol. Prog.* 24: 815-820.

Li Y.Q., Horsman M., Wang B., Wu N., Lan C.Q., (2008b). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 629–636.

Loera-Quesada M.M., and Olguín E.J., (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 1: 91-116.

Lustigman B., and Khalil A., (1994). Effects of Nickel and pH on the Growth of *Chlorella vulgaris* *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*.

Lv J.M., Cheng L.H., Xu X.H., Zhang L., Chen H.L., (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology* 101: 6797–6804.

Merchuk J.C., Gluz M., Mukmenev I., (2000). Comparison of photobioreactors for cultivation of the red microalga *Porphyridium* sp. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75:1119–26.

Mallick N., (2002), Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review *Biometals*, 15, 377–390.

Melis A., (1999). Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci*;4: 130–5.

Mohan N.P., Hanumantha R., Kumar, R.R., Sivasankaran S., Sivasubramanian V., (2009). Studies on mass cultivation of *Chlorella vulgaris* and Effective harvesting of bio-mass by low-cost methods. *J. Algal Biomass Utiln* 1: 29-39.

Molina Grima E., Fernández Sevilla, J.M., Sánchez Pérez J.A., García Camacho F., (1996). A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense

microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *J. Biotechnol.* 45, 59–69.

Morais MG. And Costa JAV., (2007b). Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Convers Manage*;48: 2169-73.

Morita M., Watanabe Y., Okawa T., Saiki H.,(2001). Photosynthetic productivity of conical helical tubular photobioreactors incorporating *Chlorella* sp. under various culture medium flow conditions. *Biotechnol. Bioengin.*74:136–44.

Morris H.J., Carrillo O.V., Almarales A., Bermúdez R.C., Alonso M.E., Borges L., Quintana M.M., Fontaine R., Llauradó G., Hernández M., (2009). Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* 87/1 with potentialities in immunonutrition. *Biotecnología Aplicada* 26: 162-165.

Papazi A., Makridis P., Divanach P., Kotzabasis K., (2008). Bioenergetic changes in the microalgal photosynthetic apparatus by extremely high CO₂ concentrations induce an intense biomass production. *Physiol. Plant* 132: 338-349.

Patiño R. J. (20,07). A study of the growth for the microalga *Chlorella vulgaris* by photo-bio-calorimetry and other on-line and off-line techniques. *Biotechnology and Bioengineering* , 96, 757–767.

Pulz O., (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*; 57:287–93.

Reitan K.I., Rainuzzo J.R., Olsen Y., (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J Phycol*, 30, 972-979.

Richmond A., (2004). *Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology*. Vol. 4.: Blackwell Science Ltd.

Raven J.A., (1997). The role of marine biota in the evolution of terrestrial biota: gases and genes —atmospheric composition and evolution of terrestrial biota. *Biogeochemistry* 1997;39: 139–64.

Rodolfi L., Zitelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M., (2009). Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low- Cost Photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102: 100-112.

Ryu HJ., Oh K.K., Kim Y.S., (2009). Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate. *J Ind Eng Chem* 2009;15:471–5.

Scarsella M., Belotti G., De Filippis P., Bravi M., (2009). Study on the optimal growing conditions of *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactors. Dept. of Chemical Engineering Materials Environment: 1-6.

Shapiro S.S. and Francia R.S., (1972). "An Approximate Analysis of Variance Test for Normality", *Journal of the American Statistical Association*, 67, 215-216.

Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P., (1998). A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from Algae. Report, U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development. Colorado, United States.

Skjanes K., Lindblad P., Muller J., (2007). BiOCO₂ — a multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products. *Biomol Eng*;24:405–13.

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87-96.

Song D., Fu J., Shi D., (2008). Exploitation of Oil-Bearing Microalgae for Biodiesel. *Chin. Journ. Biotech* 24: 341-348.

ŠOŠTARIÈ M., Golob J., Bricelj M., Klinar D., Pivec A., (2009) Studies on the Growth of *Chlorella vulgaris* in culture media with different carbon sources, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 23 (4) 471–477.

Suresh B., Ravishankar G.A., (2004). Phytoremediation — A novel and promising approach for environmental clean-up, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 24, 97–124.

Ugwu C.U., Aoyagi H., Uchiyama H., (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae, *Bioresource Technology* 99 (2008) 4021–4028.

Van Harmelen T., Oonk, H., (2006). *Microalgae Biofixation Processes: Applications and Potential Contributions to Greenhouse Gas Mitigation Options*. Report, International Network on Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement, The Netherlands.

Vonshak A., (1986). Laboratory techniques for the cultivation of microalgae, pp. 117–145. In: A. Richmond (ed.), *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Xiong W.G., (2010). Double CO₂ fixation in photosynthesis–fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresource Technology* , 101, 2287–2293.

Yan Y., and Chen C.C., (2010). Thermodynamic modeling of CO₂ solubility in aqueous solutions of NaCl and Na₂SO₄. *J. of Supercritical Fluids* 55 623–634

Yoo C., Jun S.Y., Lee J.Y., Ahn C.Y., Oh H.M., (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology* 101, S71– S74.

Yun Y.S, L.S., Park J.M., Lee C.I., Yang J.W., (1997). Carbon dioxide fixation by algal cultivation using waste water nutrients. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*.

Zame-Kofiga K., (2010). Carbon capture using the microalgae chlorella vulgaris in a packed Bubble column photobioreactor. A Thesis Submitted In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science. Youngstown.: Youngstown State University. Environmental Studies Program.

Zhang K., Kurano N., Miyachi S., (2002). Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng*; 25:97-101.

ANEXOS

ANEXO 1. REACTIVOS

Tabla 9-A1. Reactivos utilizados en el medio de cultivo.

REACTIVO	FORMULA
Nitrato de sodio	NaNO_3
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Cloruro de sodio	NaCl
Fosfato monoácido de potasio	K_2HPO_4
Fosfato diácido de potasio	KH_2PO_4
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Cloruro de manganeso tetrahidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Trióxido de molibdeno	MoO_3
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Nitrato de cobalto hexahidratado	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Ácido bórico	H_3BO_3
Etilen-diaminotetraacetato	EDTA
Hidróxido de potasio	KOH
Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Acido sulfúrico	H_2SO_4
Acido clorhídrico	HCl
Hidróxido de sodio	NaOH
Acetato de sodio trihidratado	$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Alcohol etílico	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$

ANEXO 2. MEDIO BOLD BASAL.

Tabla 10-A2. Preparación de las soluciones *Stock*.

Macronutrientes		
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
Micronutrientes		
Soluciones Stock		Para 1 L
Soluciones de elementos de traza (autoclave para disolverse)	(7) 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 Bold Basal		
Soluciones Stock		Para 2 L
Macronutrientes		20,0 mL de cada uno
Micronutrientes		2,0 mL de cada uno

Fuente: Culture Collection of Algae and Protozoa, Oban, UK)

Para los cultivos Autotróficos empleados, se modificó la cantidad de Stock 1 (solución de NaNO₃) con el fin de obtener limitaciones de nitrógeno en el medio teniendo como base de referencia el medio Bold Basal. La limitación de nitrógeno se realizó de la siguiente forma:

Tabla 11-A2. Concentración de nitrógeno utilizado.

% N stock 1	Concentración de NaNO ₃ (mM) en el medio	Volumen Utilizado (mL)
20%N	0,5883	4
30%N	0,8825	6
40%N	1,1766	8
60%N	1,7649	12
80%N	2,3532	16
100%N	2,9415*	20*

*Concentración (mM) estándar utilizada en MBB para 2L.

ANEXO 3. MONTAJE DEL CULTIVO DE *C. vulgaris*.

Primero se esterilizaron las botellas de 2 ½ litros (L) con lavados consecutivos de agua domestica, solución diluida de $\text{HCl}_{(\text{ac})}$, solución diluida de $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ y agua destilada. Posteriormente se preparó el medio Basal Bold con agua destilada como solvente y las cantidades de soluciones de cada uno de los nutrientes como lo indica la tabla (9-A2), excepto la solución stock (1- NaNO_3). Luego se realizó el inculo a una concentración de biomasa de $0,6 \text{ (g L}^{-1}\text{)}$ en un volumen de 2L. Finalmente se agregó la cantidad de solución stock de NaNO_3 deseada a cada cultivo (ANEXO 2).

Figura 10-A3. Material de inculo.



Fuente: Autores

Sistema de aireación e inyección del CO_2

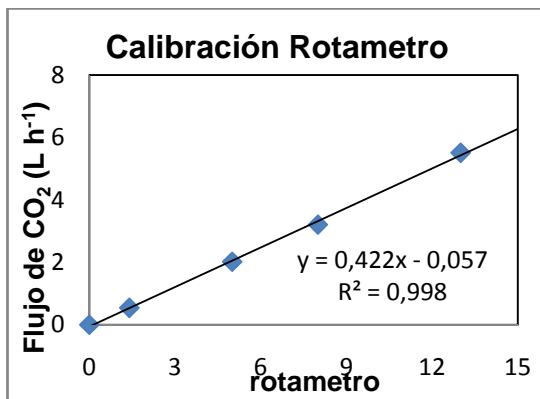
El aire se suministro por burbujeo al fotobioreactor por medio de un compresor (Thomson oilness de ½ Hp, el cual trabajo a 1,0 psi.), en la siguiente ruta: compresor – manguera - filtro (carbón activado) – manguera – difusor. El suministro de CO_2 también se realizó por burbujeo. Una serie de mangueras conectadas a una manguera principal, y esta a un cilindro de CO_2 . El flujo de CO_2

fue controlado con un regulador conectado al cilindro, un rotámetro el cual estaba conectado a uno de los cultivos, a la frecuencia de ascenso de burbujas y al tamaño de burbujas. El tamaño de las burbujas para el CO₂ eran de aprox. 2 mm de diámetro.

ANEXO 4. PORCENTAJE DE CO₂ UTILIZADO.

De acuerdo con la ecuación presentada en la grafica A1 se encontró el %CO₂ Utilizado en las etapas del proyecto.

Figura 11-A4. Calibración de rotámetro.



Fuente: Autores

Flujo total de CO₂ para cada fotobioreactor.

El aire posee (0,036% de CO₂) y como el flujo de aire es de 160,5948 (L h⁻¹), contamos con ≈0,058 (L h⁻¹) de CO₂. Teniendo en cuenta el flujo de CO₂ presente en el aire y el suministrado de forma directa por una bala de CO₂, hallamos el porcentaje utilizado en el laboratorio.

$$\%CO_2 (etapa 1) = \left(\frac{\text{flujo } CO_2}{\text{flujo aire} + \text{flujo } CO_2} \right) * 100$$

$$\%CO_2 (etapa 1) = \left(\frac{0,057814 + 3,7228}{160,594796 + 3,7228} \right) * 100$$

$$\%CO_2 (etapa 1) = 2,300796 \cong 2,3$$

$$\%CO_2 (etapa 2-3) = \left(\frac{0,057814 + 3,7228}{160,594796 + 3,7228} \right) * 100$$

$$\%CO_2 (etapa 2-3) = 3,794659 \cong 3,8$$

Tabla 12-A4. Flujos de CO₂ utilizados.

Etapas	Flujo rotámetro	Flujo (L h ⁻¹) botella
1	9	3,7228
2	15	6,2743
3	15	6,2743

ANEXO 5. MÁXIMA SOLUBILIDAD TEÓRICA DEL DIÓXIDO DE CARBONO EN EL MEDIO.

Para encontrar el punto de saturación teórico en agua pura, se han realizado varios estudios (Bahadori *et al.*, 2009), (Carroll *et al.*, 1991), (Dodds *et al.*, 1956), (Duan and Sun, 2002).

Con el fin de encontrar de encontrar la cantidad máxima teórica de CO₂ que puede disolver la cantidad de medio, se encontró la solubilidad del CO₂ en agua pura. Los otros compuestos presentes en el medio y la cantidad de alga son tomados como ruido. Esta solubilidad permite contar con un límite superior con respecto al intervalo de cantidad de gas diluido en el medio. La fracción molar de saturación de CO₂ en una solución a las condiciones de 1 atm de presión y temperatura de 25 °C es de $0,609 * 10^{-3}$ (Carroll *et al.*, 1991).

Tomando como referencia esta fracción molar, la solubilidad del CO₂ en agua pura a las condiciones establecidas es 0,1489 (g CO₂ / 100 g H₂O).

$$X_{CO_2} = 0,609 * 10^{-3}$$

$$X_{CO_2} + X_{H_2O} = 1$$

$$X_{H_2O} = 1 - X_{CO_2}$$

$$X_{CO_2} = 0,999391$$

BASE DE CALCULO: 100 g de agua = 50/9 moles de CO₂

$$X_{CO_2} = N_{CO_2} / (N_{CO_2} + N_{H_2O})$$

Despejando el número de moles de CO₂

$$N_{CO_2} = X_{CO_2} * N_{CO_2} / (1 - X_{CO_2})$$

$$N_{CO_2} = 3,385395039 * 10^{-3}$$

Luego,

$$\begin{aligned}N_{CO_2} &= \text{CANTIDAD DE CO}_2 / \text{MASA MOLAR DE CO}_2 \\ \text{CANTIDAD DE CO}_2 &= N_{CO_2} * \text{MASA MOLAR DE CO}_2 \\ \text{CANTIDAD DE CO}_2 &= 0,148957381 \text{ gramos de CO}_2\end{aligned}$$

Esta es la cantidad de CO₂ presente en 100 g o 100 ml de agua. Este resultado fue corroborado con los datos relacionados por (Dodds, W.S, et al)

Ahora,

$$\begin{aligned}\text{CANTIDAD DE CO}_2 \text{ DISUELTO EN LOS } 2000 \text{ ml DE MEDIO} \\ &= 0,148957381 * 2000 / 100 \\ \text{CANTIDAD DE CO}_2 \text{ DISUELTO EN LOS } 2000 \text{ ml DE MEDIO} \\ &= 2,978 \text{ gramos de CO}_2\end{aligned}$$

ANEXO 6. ANÁLISIS DEL DISEÑO FACTORIAL, DATOS SOFTWARE DEMO-MINITAB.

Algunas pruebas utilizadas para determinar la normalidad en la distribución de los datos ($P > 0,05$). Este análisis se desarrollo en el *software* Demo-Minitab antes de realizar el diseño factorial completo.

1. Diseño factorial variable de respuesta P_{max} .

Figura 12-A6. Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. (P_{max})

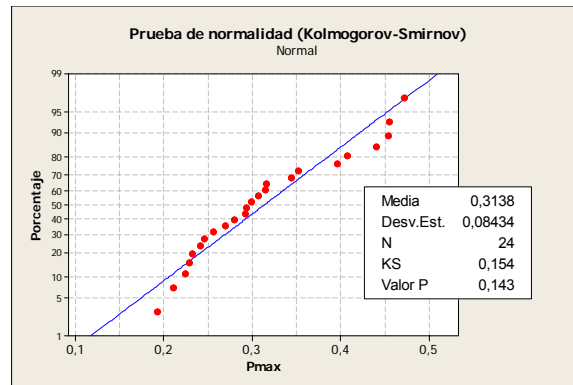
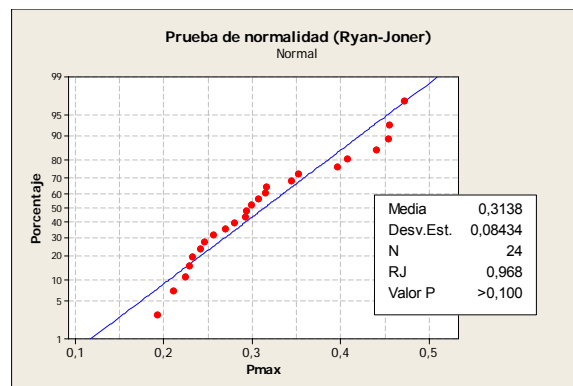


Figura 13-A6. Prueba de normalidad de Ryan- Joner. (P_{max})



Pruebas de normalidad e igualdad de varianzas.

Figura 14-A6. Homogeneidad de Varianzas (P_{max}).

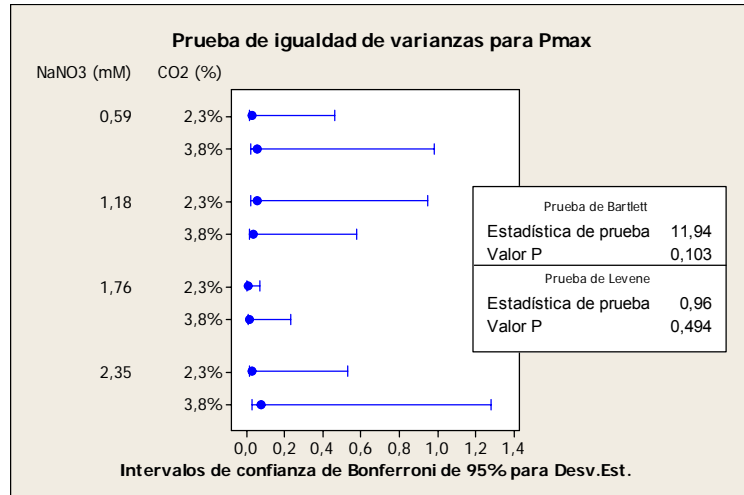
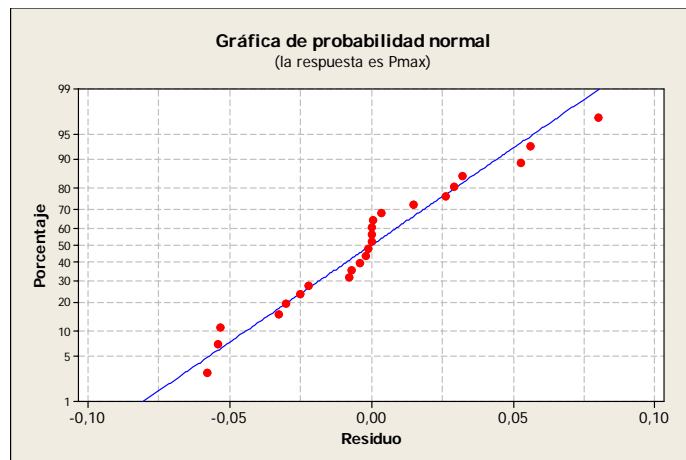


Figura 15-A6. Gráfica de Probabilidad normal (residuos) en el análisis de P_{max} .



2. Diseño factorial variable de respuesta Clorofila _{a+b}.

Tabla 13-A6. Disposición general para el diseño bifactorial en la variable de respuesta clorofila (mg L^{-1}).

Concentración inicial NaNO ₃ (mM)	%CO ₂	
	2,3	3,8
0,59	42,920	48,740
	45,214	37,452
	40,626	40,488
1,18	46,550	71,484
	63,366	67,360
	29,718	69,524
1,76	40,012	58,132
	44,714	69,968
	35,390	54,480
2,35	34,980	65,504
	32,818	55,572
	28,348	62,924

También para este análisis se aplicó pruebas de normalidad y un test de homogeneidad de varianza del efecto carbono/nitrato sobre la cantidad de clorofila, obteniendo valores $p > 0,05$. Por lo tanto se cuenta con datos distribuidos normalmente.

Figura 16-A6. Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. $C_{(a+b)}$

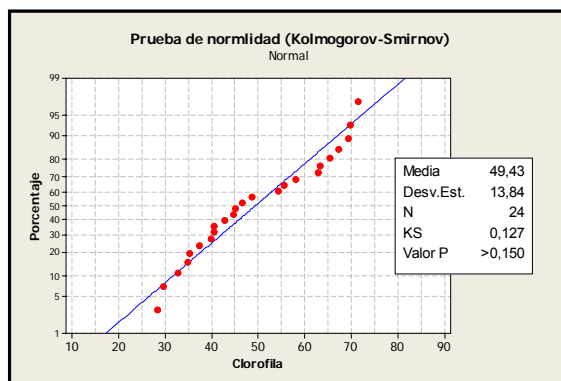


Figura 17-A6. Prueba de normalidad (Ryan- Joner). $C_{(a+b)}$

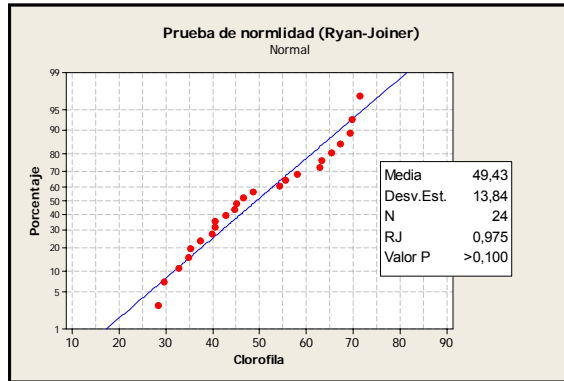


Figura 18-A6. Homogeneidad de Varianzas para datos $C_{(a+b)}$

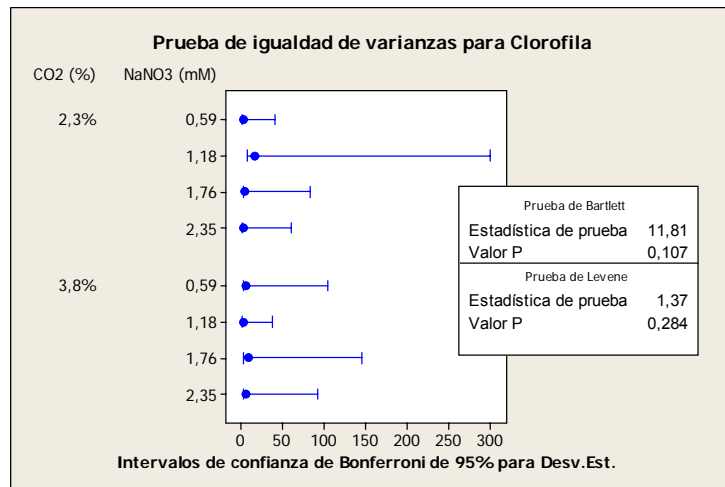
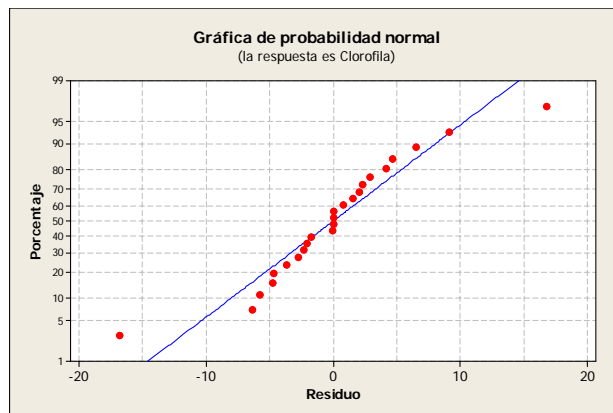
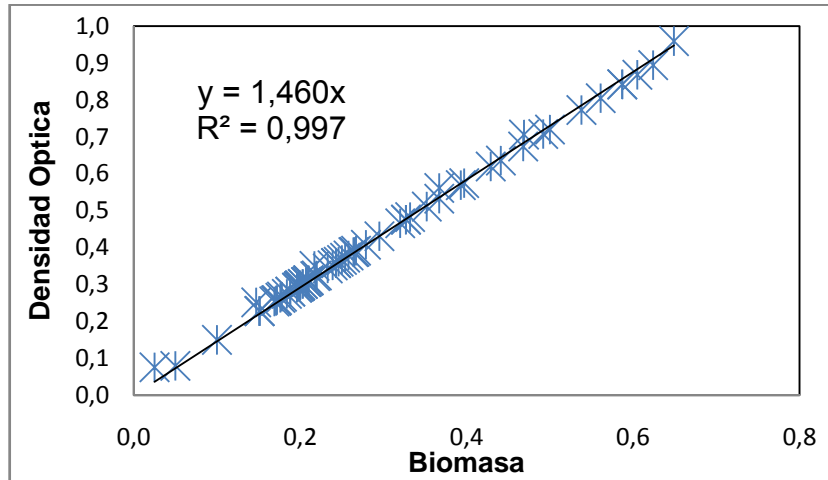


Figura 19-A6. Grafica de Probabilidad normal (residuos) en el análisis de $C_{(a+b)}$.



ANEXO 7. RELACION DENSIDAD OPTICA – BIOMASA

Figura 20-A7. Dispersión de los datos para obtención del coeficiente másico de extinción.



Para determinar la relación lineal entre las dos variables (Densidad óptica – biomasa), se elaboró un diagrama de dispersión (figura 20-A7) utilizando los datos hallados a las mismas condiciones y en pruebas anteriores por Gonzales, (2010).

La regresión lineal obtenida en la figura (20-A7), brinda una ecuación que representa la ley de Beer-Lambert.

ANEXO 8. ANÁLISIS CINÉTICO DE LOS CULTIVOS

El análisis cinético se realizó con base a modelo planteado por monod.

Las cantidades de biomasa obtenidas a partir de las densidades ópticas, se graficaron de manera semilogarítmica con respecto al tiempo, es decir $\ln(10 \cdot X)$ con respecto a los 5 días de cultivo.

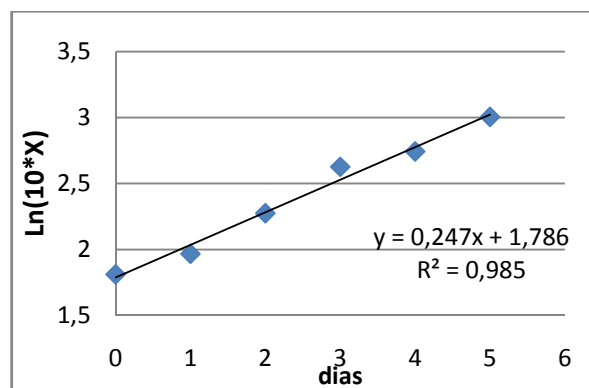
Posteriormente se analizaron los puntos para cada cultivo con el fin de encontrar la fase de crecimiento descrita por una línea recta. Esta línea recta, su pendiente representa la velocidad máxima específica de crecimiento, tal como lo muestra la ecuación,

$$\ln(x) = \ln(x_0) + \mu t$$

μ es la pendiente de la recta en la fase de crecimiento, X_0 es la cantidad de biomasa inicial y X es la cantidad de biomasa en el tiempo t (días).

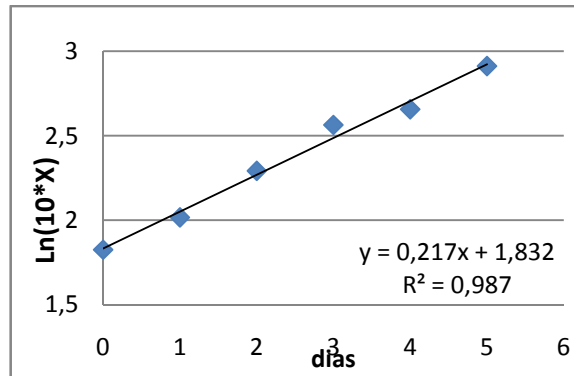
Figuras para la primera fase

Figura 21-A8. Cinética de crecimiento para 0,59mM de NaNO_3



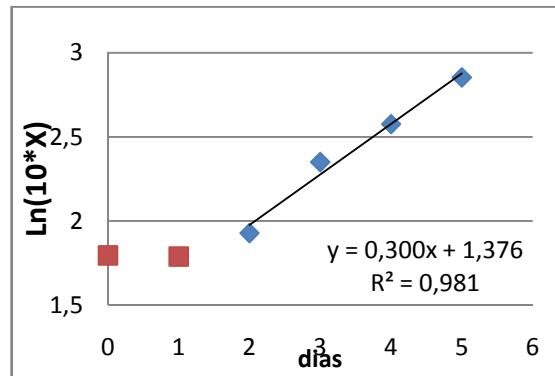
Fuente: los autores

Figura 22-A8. Cinética de crecimiento para 1,18mM de NaNO₃



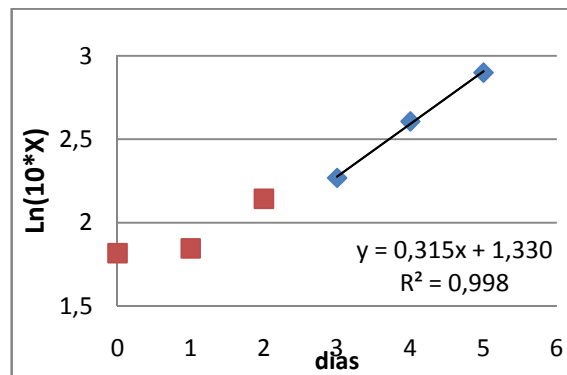
Fuente: los autores

Figura 23-A8. Cinética de crecimiento para 1,76mM de NaNO₃



Fuente: los autores

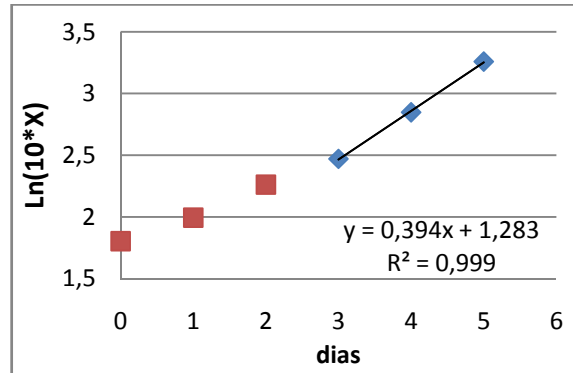
Figura 24-A8. Cinética de crecimiento para 2,35mM de NaNO₃



Fuente: los autores

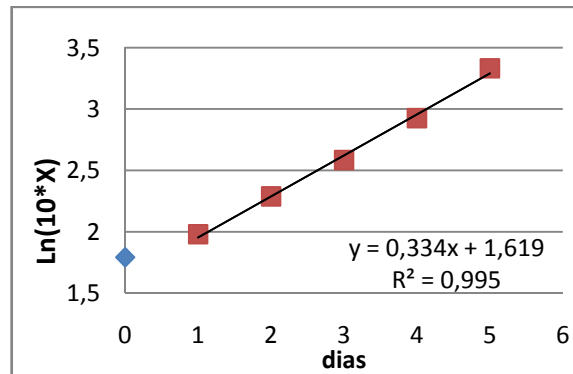
Figuras para la segunda fase de experimento.

Figura 25-A8. Cinética de crecimiento para 0,59mM de NaNO_3



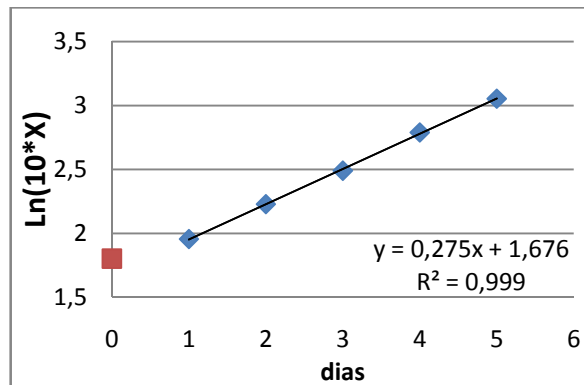
Fuente: los autores

Figura 26-A8. Cinética de crecimiento para 1,18mM de NaNO_3



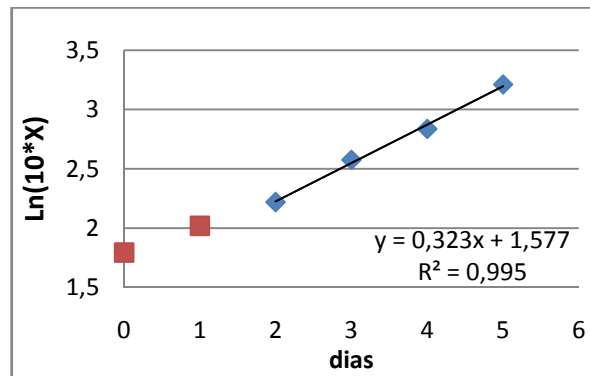
Fuente: los autores

Figura 27-A8. Cinética de crecimiento para 1,76mM de NaNO_3



Fuente: los autores

Figura 28-A8. Cinética de crecimiento para 2,35mM de NaNO₃



Fuente: los autores