

“Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos”

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**OPCION I.- TESIS**

**TRABAJO PROFESIONAL**

**“DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE OPERACIÓN DE ALTO  
DESEMPEÑO DEL PROCESO DE FIJACIÓN DE CO<sub>2</sub> PARA SU  
IMPLEMENTACIÓN EN FOTOBIORREACTORES TUBULARES A ESCALA  
PILOTO”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN INGENIERÍA QUÍMICA**

**PRESENTA:**

***I.Q. Maria Betsabe Herrera Yañez***

**DIRECTOR DE TESIS:**

***Dr. Juan Manuel Méndez Contreras***

**CODIRECTOR DE TESIS:**

***Dr. Alejandro Alvarado Lassman***





"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

FECHA: 25/05/2017  
DEPENDENCIA: POSGRADO  
ASUNTO: Autorización de Impresión  
OPCIÓN: I

C. MARIA BETSABE HERRERA YAÑEZ  
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN:  
CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"DETERMINACION DE CONDICIONES DE OPERACION DE ALTO DESEMPEÑO DEL PROCESO DE FIJACION DE CO2 PARA SU IMPLEMENTACION EN FOTOBIOREACTORES TUBULARES A ESCALA PILOTO".

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E

  
M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES  
JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO

C.A. TITULACIÓN



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO  
TECNOLÓGICO  
DE ORIZABA

ggc



"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

FECHA : 17/05/2017

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES  
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACION.  
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C. :

MARIA BETSABE HERRERA YAÑEZ

la cual lleva el título de:

"DETERMINACION DE CONDICIONES DE OPERACION DE ALTO DESEMPEÑO DEL  
PROCESO DE FIJACION DE CO2 PARA SU IMPLEMENTACION EN  
FOTOBIOREACTORES TUBULARES A ESCALA PILOTO".

Y concluyen que se acepta.

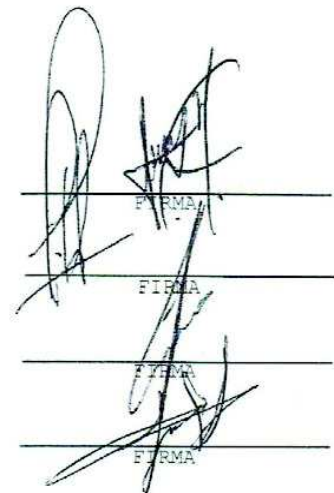
A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : DR. JUAN MANUEL MENDEZ CONTRERAS

SECRETARIO : DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN

VOCAL : M.I. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTU

VOCAL SUP. : DRA. GUADALUPE LUNA SOLANO



EGRESADO(A) DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

OPCION: I Tesis



## **AGRADECIMIENTOS**

**Dr. Juan Manuel Méndez Contreras** se le agradece el haberme permitido ser parte de su grupo de investigación, por su dirección en la realización del proyecto, su contribución académica, sus observaciones constructivas, sus consejos y sus conocimientos impartidos en clase.

**Dr. Alejandro Alvarado Lassman** se le agradece su disponibilidad, sus observaciones, sus consejos y sus conocimientos impartidos en clase.

**M. I. Q. Norma Vallejo Cantú** se le agradece su disponibilidad, sus observaciones, aportaciones y sus conocimientos impartidos en clase.

**Dra. Guadalupe Luna Solano** se le agradece su disponibilidad, sus observaciones, aportaciones y sus conocimientos impartidos en clase.

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada con número de registro 662915 para la conclusión de la maestría.

## RECONOCIMIENTOS

Se muestran las participaciones en congresos como resultado del desarrollo del trabajo de tesis:

### Presentaciones en congresos

- |               |  |
|---------------|--|
| 2016 Cartel   | Determinación de la dosis recomendable de medio de cultivo para el óptimo crecimiento de <i>Chlorella spp.</i> XXXVII Encuentro nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. 03 al 06 de mayo. Puerto Vallarta Jalisco, México. |
| 2016 Ponencia | Caracterización fisicoquímica y reológica durante el crecimiento de <i>Chlorella spp</i> en medio Bold Basal. XV Congreso Internacional. XXI. Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Instituto Tecnológico del valle de Oaxaca. Oaxaca, México.                        |

**RESUMEN****DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE OPERACIÓN DE ALTO DESEMPEÑO  
DEL PROCESO DE FIJACIÓN DE CO<sub>2</sub> PARA SU IMPLEMENTACIÓN EN  
FOTOBIORREACTORES TUBULARES A ESCALA PILOTO****Elaborada por: Ing. Maria Betsabe Herrera Yañez****Dirigida por: Dr. Juan Manuel Méndez Contreras****Co-dirigida: Dr. Alejandro Alvarado Lassman**

Hoy en día es innegable la existencia de un cambio climático, el cual involucra sequías, inundaciones y/o acidificación de océanos a nivel local y global, siendo la actividad humana la principal responsable, como es el caso de los combustibles fósiles. A su vez el gran desarrollo industrial implica un gran daño en la calidad de las aguas y aire debido a la gran cantidad de productos contaminantes generados como nutrientes y CO<sub>2</sub>. Actualmente la investigación de las microalgas ha crecido de manera impresionante debido a la capacidad de biofijación de CO<sub>2</sub> y al valor agregado que estas tienen. Además se ha buscado el desarrollo de tecnologías limpias, de bajo costo orientadas al cuidado del medio ambiente.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las condiciones ambientales de nutrientes, luminosidad y CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento celular de la microalga *Chlorella spp* y su producción de carbohidratos, lípidos, proteínas y clorofilas. Los mejores resultados obtenidos fue una dosis de 1.5 mL/L de nutrientes, 4000 Lux de luminosidad y 2 % v/v de CO<sub>2</sub>. Obteniendo un máximo crecimiento celular de  $7.26 \times 10^7$  cel/mL.

El fotobiorreactor tubular airlift se diseñó con un diámetro de 15.26 cm y una altura de 200 cm de material acrílico, ésto con la finalidad de que permitiera un adecuado crecimiento de la microalga, una mejora en la calidad de biomasa y en la fijación de CO<sub>2</sub>. Se determinó que la microalga pudo crecer a un máximo crecimiento celular  $2.1 \times 10^7$  cel/mL y puede crecer en amplios rangos de pH (4-10), obteniendo una buena calidad de biomasa. Se obtuvo un máximo de 91.92% de CO<sub>2</sub> consumido y con una tasa de fijación de 0.63 g/L d.

**ABSTRACT****DETERMINATION OF HIGH PERFORMANCE OPERATING CONDITIONS OF THE CO<sub>2</sub> FIXING PROCESS FOR IMPLEMENTATION IN TUBULAR PHOTOBIOREACTORS AT PILOT SCALE****Author: Maria Betsabe Herrera Yañez****Thesis adviser: Dr. Juan Manuel Méndez Contreras****Thesis co-adviser: Dr. Alejandro Alvarado Lassman**

Today there is undeniable climate change, which involves sequencing, flooding and/or acidification of the oceans at local and global levels, with human activity being the main culprit, as in the case of the combustion of fossil fuels. At the same time the great industrial development implies a great damage in the quality of the waters and air due to the great amount of polluting products generated like nutrients and CO<sub>2</sub>. Currently the research of microalgae has grown dramatically due to the bio-fixing capacity of CO<sub>2</sub> and the added value they have. Besides, we have sought the development of clean technologies, low cost oriented to care for the environment.

The goal of this work was to evaluate the environmental conditions of nutrients, luminosity and CO<sub>2</sub> on the cell growth of the microalga *Chlorella spp* and its production of carbohydrates, lipids, proteins and chlorophylls. The best result obtained in nutrient dose was 1.5 mL/L, 4000 Lux of luminosity and 2% v/v of CO<sub>2</sub>. Obtaining a maximum cell growth of  $7.26 \times 10^7$  cells/mL.

The airlift tubular photobioreactor was designed with a diameter of 15.26 cm and a height of 200 cm of acrylic material, in order to allow an adequate growth of the microalga, an improvement in biomass quality and CO<sub>2</sub> fixation. It was determined that the microalga grew at a maximum cell growth of  $2.1 \times 10^7$  cells/mL and can grow at wide pH ranges (4-10), obtaining good biomass quality. A maximum of 91.92 % of CO<sub>2</sub> consumed and a fixation rate of 0.63 g/L d was obtained.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	I
LISTA DE TABLAS.....	V
NOMENCLATURA .....	VII
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVOS .....	3
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....	5
1.1. Situación actual de las emisiones de CO <sub>2</sub> en México.....	5
1.1.1. Digestión anaerobia y la producción de CO <sub>2</sub> .....	6
1.1.2. Tecnologías para la captura y fijación de CO <sub>2</sub> .....	7
1.2. Algas .....	10
1.2.1. Importancia económica de las algas .....	10
1.3. Microalgas .....	12
1.3.1. Crecimiento .....	12
1.4. Condiciones ambientales para el crecimiento de las microalgas.....	14
1.4.1. Luz .....	14
1.4.1.1. Ciclos de luz-oscuridad .....	15
1.4.2. Temperatura.....	16
1.4.3. Agitación .....	17
1.4.4. pH.....	18
1.4.5. Nutrientes.....	19
1.4.6. Dióxido de carbono .....	19
1.5. Microalga <i>Chlorella spp</i> .....	20
1.5.1. Aprovechamiento .....	21
1.6. Sistemas de cultivo para las microalgas.....	22
1.6.1. Comparación de sistemas de cultivo.....	22
1.6.2. Fotobiorreactores con microalgas .....	24
1.6.3. Fotobiorreactores airlift.....	25
1.6.3.1. Ventajas y desventajas de los biorreactores airlift .....	27
1.6.4. Materiales de construcción.....	28
1.7. Parámetros de diseño de un fotobiorreactor .....	29



---

1.7.1. Similitudes influyentes en los sistemas .....	30
1.8. Hidrodinámica de cultivos microalgales.....	31
1.9 Importancia del secuestro de CO <sub>2</sub> .....	32
1.10 Estudios de los procesos biológicos de secuestro de CO <sub>2</sub> para la depuración de corrientes.....	32
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
2.1. Etapa I. Evaluación de las variables ambientales: Luminosidad, nutrientes, CO <sub>2</sub>	35
2.1.1. Obtención y adaptación de la microalga <i>Chlorella spp.</i> .....	35
2.1.2. Adecuación de diseño experimental .....	36
2.1.2.1. Determinación de dosis recomendable de nutrientes .....	36
2.1.2.2. Determinación de dosis recomendable de luminosidad y CO <sub>2</sub> .....	37
2.1.3. Caracterización de la biomasa producida .....	38
2.1.3.1. Determinación de la densidad celular .....	38
2.1.3.2. Tasa de crecimiento celular .....	39
2.1.3.3. Determinación de la densidad celular-absorbancia .....	40
2.1.3.4. Determinación de proteínas .....	40
2.1.3.5. Determinación del contenido de carbohidratos .....	40
2.1.3.6. Determinación de lípidos.....	41
2.1.3.9. Determinación de la tasa de fijación CO <sub>2</sub> .....	41
2.2. Etapa II. Diseño de un fotobiorreactor tubular airlift a escala piloto.....	42
2.2.1. Ingeniería conceptual .....	43
2.2.2. Ingeniería Básica y de detalle .....	43
2.3. Etapa III. Montaje del fotobiorreactor tubular airlift a escala piloto .....	44
2.4. Etapa IV. Implementación de las variables ambientales recomendables en el fotobiorreactor a escala piloto .....	45
2.5. Etapa V. Evaluación y caracterización de la biomasa producida a escala piloto.....	46
2.5.1.1. Determinación de la densidad celular .....	46
2.5.1.2. Determinación de proteínas .....	46
2.5.1.3. Determinación del contenido de carbohidratos .....	46
2.5.1.4. Determinación de lípidos.....	46

---

2.5.1.5.	Determinación de clorofilas.....	46
2.5.1.6.	Determinación de la tasa de fijación CO <sub>2</sub> .....	47
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		49
■	Curva de calibración de <i>Chlorella spp.</i> .....	49
■	Diseño unifactorial.....	50
3.2.1	Densidad celular.....	50
3.2.2	Determinación de dosis recomendable de nutrientes.....	51
3.2.3	Caracterización de la biomasa producida.....	52
3.2.3.1.	pH.....	52
3.2.3.2.	Densidad celular por espectrofotometría.....	53
3.2.3.3.	Tasa de crecimiento celular.....	54
3.2.3.4.	Determinación de carbohidratos.....	55
3.2.3.5.	Determinación de lípidos.....	56
3.2.3.6.	Determinación de proteínas.....	57
3.2.3.7.	Determinación de clorofilas.....	58
■	Diseño 3 <sup>2</sup> .....	59
3.3.1	Determinación de dosis recomendable de luminosidad y CO <sub>2</sub> .....	59
3.3.2	Densidad celular y pH.....	62
3.3.3	Oxígeno disuelto.....	65
■	Diseño de un fotobiorreactor tubular airlift a escala piloto.....	67
3.4.1	Relación de proporcionalidad.....	68
3.4.2	Ingeniería conceptual.....	69
3.4.3	Ingeniería básica y de detalle.....	72
■	Montaje del fotobiorreactor tubular airlift a escala piloto.....	75
3.5.1	Material de construcción del fotobiorreactor.....	76
3.5.2	Construcción del fotobiorreactor.....	76
3.5.3	Instalación de la base para fotobiorreactores.....	78
3.5.4	Instalación de lámparas y panel de control.....	79
3.5.5	Instalación de fotobiorreactores, soportes y abrazaderas.....	79
3.5.6	Instalación de bombas y tuberías de recirculación.....	80
3.5.7	Instalación de tuberías para suministro de CO <sub>2</sub> .....	81

---

3.5.8 Pruebas hidráulicas y de operación.....	82
■ Implementación de las variables ambientales recomendables en el fotobiorreactor a escala piloto .....	82
■ Evaluación y caracterización de la biomasa producida a escala piloto ....	83
3.7.1 Densidad celular .....	83
3.7.2 Tasa de crecimiento celular .....	85
3.7.3 pH y alcalinidad .....	85
3.7.4 Peso seco .....	87
3.7.5 Lípidos, proteínas y carbohidratos.....	87
3.7.6 Clorofilas.....	89
3.7.7 Tasa de fijación y porcentaje de CO <sub>2</sub> consumido .....	90
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	97
ANEXO A .....	102
ANEXO B .....	106
ANEXO C .....	108
ANEXO D .....	130
ANEXO E .....	137
ANEXO F.....	142
ANEXO G.....	145
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	148

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1 Principales países con mayor volumen de emisiones anuales de GEI a nivel mundial.....	5
1.2 Emisiones de CO <sub>2</sub> por consumo energético por sector .....	6
1.3 Curva representativa de crecimiento de un cultivo de microalgas en un volumen limitado.....	13
1.4 Trayectoria de la luz y de los ciclos luz/oscuridad .....	14
1.5 Concentración de CO <sub>2</sub> e iluminación durante el anabolismo.....	16
1.6 Tasa de crecimiento en función de la intensidad luminosa a distintas temperaturas.....	17
1.7 Dependencia del pH de las especies químicas del sistema carbonato .....	18
1.8 Partes características de un biorreactor airlift .....	26
1.9 Configuraciones de biorreactores airlift. ....	27
1.10 Régimen de flujo homogéneo y heterogéneo .....	31
2.1 Metodología.....	34
2.2 Adaptación de la microalga <i>Chlorella spp</i> .....	35
2.3 Soluciones stocks.....	36
2.4 Evaluación de CO <sub>2</sub> y luminosidad con la dosis recomendable.....	38
3.1 Curva de calibración de alga <i>Chlorella spp</i> .....	49
3.2 Densidad celular promedio a diferentes dosis de medio de cultivo .....	50
3.3 Comportamiento promedio de pH .....	53
3.4 Comportamiento promedio de absorbancia.....	54
3.5 Curva de calibración de glucosa .....	55
3.6 Determinación de carbohidratos a diferentes concentraciones .....	56
3.7 Determinación de lípidos a diferentes concentraciones .....	57
3.8 Determinación de proteínas a diferentes concentraciones.....	58
3.9 Determinación de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> a diferentes concentraciones.....	59
3.10 Diagrama de evaluación de CO <sub>2</sub> sobre la densidad celular .....	61
3.11 Diagrama de evaluación de luminosidad sobre la densidad celular .....	61
3.12 Crecimiento celular en relación con el suministro de CO <sub>2</sub> y luminosidad ..	62

3.13	Comportamiento de pH durante el suministro de CO <sub>2</sub> y luminosidad de 2000 lux .....	63
3.14	Comportamiento de pH durante el suministro de CO <sub>2</sub> y luminosidad de 3000 lux .....	64
3.15	Comportamiento de pH durante el suministro de CO <sub>2</sub> y luminosidad de 4000 lux .....	64
3.16	Producción de oxígeno disuelto durante el suministro de CO <sub>2</sub> y luminosidad 2000 lux .....	66
3.17	Producción de oxígeno disuelto durante el suministro de CO <sub>2</sub> y luminosidad 3000 lux .....	66
3.18	Producción de oxígeno disuelto durante el suministro de CO <sub>2</sub> y luminosidad 4000 lux .....	67
3.19	Simbología de diagrama P&ID .....	73
3.20	Área seleccionada para implementación de los fotobiorreactores .....	75
3.21	Construcción de bridas e implementación en fotobiorreactores .....	77
3.22	Construcción de fotobiorreactor y adaptación de suministro de CO <sub>2</sub> .....	78
3.23	Base para fotobiorreactor, lámparas y control de bombas .....	79
3.24	Instalación de mini base, abrazaderas y fotobiorreactores.....	80
3.25	Instalación de tuberías y soporte para recirculación .....	81
3.26	Instalación de tuberías para suministro de CO <sub>2</sub> . .....	81
3.27	Pruebas hidráulicas en fotobiorreactores .....	82
3.28	Implementación de variables ambientales en fotobiorreactores en planta piloto .....	83
3.29	Densidad celular del fotobiorreactor airlift a escala piloto.....	84
3.30	pH en fotobiorreactor airlift en planta piloto .....	86
3.31	Alcalinidad de fotobiorreactor airlift en planta piloto .....	87
3.32	Clorofilas en fotobiorreactor airlift en planta piloto.....	90
3.33	Porcentajes de CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> en el fotobiorreactor airlift.....	93
3.34	Comparativo del crecimiento celular y el porcentaje de CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> .....	94

**ANEXO C**

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
AC. 1 Diseño de fotobiorreactor airlift.....	108
AC. 2 Diseño de fotobiorreactor airlift vista frontal y superior.....	109
AC. 3 Base para fotobiorreactor vista frontal.....	110
AC. 4 Base para fotobiorreactor vista lateral.....	111
AC. 5 Bridas vista superior.....	112
AC. 6 Bridas vista lateral.....	113
AC. 7 Gabinete de bombas, vista frontal y lateral.....	114
AC. 8 Mini base para soporte de fotobiorreactores.....	115
AC. 9 Recirculación en fotobiorreactores.....	116
AC. 10 Recirculación en fotobiorreactores vista lateral.....	117
AC. 11 Soporte para recirculación vista frontal.....	118
AC. 12 Soporte para recirculación vista superior.....	119
AC. 13 Soporte para fotobiorreactores vista superior.....	120
AC. 14 Soporte para fotobiorreactores vista lateral.....	121
AC. 15 Soporte para tanque CO <sub>2</sub> vista superior.....	122
AC. 16 Soporte para tanque CO <sub>2</sub> vista lateral.....	123
AC. 17 Suministro de CO <sub>2</sub> en fotobiorreactores vista lateral.....	124
AC. 18 Diagrama de flujo del proceso en planta piloto.....	125
AC. 19 Diagrama de bloques del proceso en planta piloto.....	126
AC. 20 Layout de planta piloto.....	127
AC. 21 Diseño P&ID.....	128

**ANEXO E**

AE. 1 Diagrama de Moody.....	140
------------------------------	-----

---

---

**ANEXO D**

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
AD. 1 Codificación de un instrumento en un P&ID .....	131
AD. 2 Letras de identificación para equipos .....	132
AD. 3 Símbolos de líneas de conexión de instrumento a instrumento .....	133
AD. 4 Símbolos de instrumentos secundarios.....	133
AD. 5 Símbolos de elementos finales de control .....	134
AD. 6 Simbología de equipos del proceso .....	135

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. 1	Importancia económica de las algas ..... 11
1. 2	Clasificación científica del género <i>Chlorella</i> ..... 20
1. 3	Características de la microalga <i>Chlorella spp.</i> ..... 20
1. 4	Ventajas y limitaciones de varios sistemas de cultivo de microalgas. .... 22
1. 5	Propiedades de materiales para construcción de fotobiorreactores. .... 29
2. 1	Variables ambientales obtenidas por para el crecimiento de <i>Chlorella spp.</i> ..... 35
2. 2	Variables ambientales consideradas para su evaluación ..... 36
2. 3	Niveles del diseño unifactorial ..... 37
2. 4	Factores y niveles del diseño $3^2$ ..... 38
2. 5	Condiciones recomendables obtenidas ..... 45
3. 1	ANOVA para las cinéticas de aplicación de micronutrientes, macronutrientes y vitaminas ..... 51
3. 2	Prueba de Duncan para cinéticas de aplicación de micronutrientes, macronutrientes y vitaminas ..... 52
3. 3	Tasa de crecimiento celular ..... 55
3. 4	ANOVA para cinéticas en la evaluación de CO <sub>2</sub> y luminosidad ..... 60
3. 5	Prueba de Duncan para cinéticas de aplicación de luminosidad y CO <sub>2</sub> .... 60
3. 6	Razones de proporcionalidad (nL) geométrica ..... 69
3. 7	Volumen de operación calculado del fotobiorreactor ..... 70
3. 8	Potencia de la bomba y caudal ..... 72
3. 9	Listado de equipos en fotobiorreactores ..... 73
3. 10	Lista de accesorios y materiales ..... 74
3. 11	Parámetros de diseño del fotobiorreactor ..... 76
3. 12	Crecimiento celular, tiempo de duplicación y generaciones en fotobiorreactor ..... 85
3. 13	Caracterización de la biomasa producida de <i>Chlorella spp</i> en fotobiorreactor airlift en planta piloto ..... 88
3. 14	Productividad volumétrica y tasa de fijación de CO <sub>2</sub> en el fotobiorreactor 91



3. 15	Resultados de análisis cromatográfico durante el monitoreo del fotobiorreactor airlift en planta piloto .....	92
-------	---	----

**ANEXO A**

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
AA. 1	Curva estándar de glucosa .....	103

**ANEXO B**

AB. 1	Soluciones Stock para MBB (Medio Bold Basal). .....	106
-------	---	-----

**ANEXO F**

AF. 1	Especificaciones técnicas de los equipos .....	142
-------	--	-----

**ANEXO G**

AG. 2	Especificaciones funcionales de los equipos .....	145
-------	---	-----

---

---

**NOMENCLATURA**

<b><i>A</i></b>	Área transversal
<b><i>A<sub>base</sub></i></b>	Área de la base
<b><i>A<sub>d</sub></i></b>	Área del <i>downcomer</i>
<b><i>A<sub>r</sub></i></b>	Área del <i>riser</i>
<b><i>atm</i></b>	Atmósfera
<b><i>ATP</i></b>	Adenosina trifosfato
<b><i>CO<sub>2e</sub></i></b>	Dióxido de carbono equivalente
<b>°C</b>	Grado centigrado celsius
<b><i>cm</i></b>	Centímetro
<b>D</b>	Densidad celular
<b><i>Dd</i></b>	Diametro del <i>downcomer</i>
<b><i>Dr</i></b>	Diametro del <i>riser</i>
<b><i>g</i></b>	Gravedad
<b><i>h</i></b>	Distancia vertical del medio de cultivo
<b><i>H</i></b>	Altura total del equipo
<b><i>kJ</i></b>	kiloJoule
<b><i>kg</i></b>	kilogramo
<b><i>k<sub>La</sub></i></b>	Coefficiente de transferencia de masa
<b>K</b>	Grados Kelvin
<b><i>lux</i></b>	Luxes
<b><i>lm</i></b>	Lumens
<b>ln</b>	Logaritmo natural
<b>L</b>	Litro

---

---

<b>L</b>	Longitud
<b><math>L_m</math></b>	Longitud del modelo
<b><math>L_p</math></b>	Longitud del prototipo
<b><math>mm</math></b>	Milímetro
<b><math>MTon</math></b>	Mega tonelada
<b><math>mg</math></b>	Miligramo
<b><math>m^2</math></b>	Metro cuadrado
<b><math>m^3</math></b>	Metro cúbico
<b><math>M</math></b>	Peso molecular
<b><math>MCO_2</math></b>	Peso molecular del $CO_2$
<b><math>nm</math></b>	Nanómetro
<b><math>NADPH</math></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b><math>n_L</math></b>	Escala de proporcionalidad
<b><math>P_e</math></b>	Presión de salida
<b><math>P_0</math></b>	Presión del atmosférica
<b><math>Q</math></b>	Caudal
<b><math>R</math></b>	Constante de los gases
<b><math>rd</math></b>	radio del <i>downcomer</i>
<b><math>s</math></b>	Segundo
<b><math>T</math></b>	Temperatura
<b><math>t_d</math></b>	Tiempo de duplicación
<b><math>V_{op}</math></b>	Volumen de operación
<b><math>V_{Td}</math></b>	Volumen total del <i>downcomer</i>
<b><math>V_T</math></b>	Volumen total del equipo
<b><math>V_t</math></b>	Tapas del equipo

---

---

$V$	Volumen
$\%V/V$	Porcentaje volumen/volumen
$V_{cultivo}$	Volumen del cultivo
$v$	Velocidad del aire
$W$	Watts
$X_0$	Densidad celular al tiempo inicial
$X_1$	Densidad celular al tiempo t
$yCO_2$	Fracción molar del $CO_2$
$\mu m$	Micrómetro
$\mu$	velocidad o tasa de crecimiento
$\gamma$	Razón de calores específicos
$\rho$	Densidad del líquido
$\pi$	Pi

## INTRODUCCIÓN

El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es producido de manera natural en la atmósfera, y a pesar de esto, también es considerado como un Gas de Efecto Invernadero (GEI). Su producción se ha incrementado en exceso con ayuda del desarrollo y el crecimiento de la civilización humana. A partir de la llamada Revolución Industrial hasta nuestros días los procesos industriales se desarrollan quemando combustibles fósiles (petróleo, gas y sus derivados, como la gasolina) y aprovechando de manera desmedida los recursos naturales; esta acción ha llevado a que aumente la concentración de los GEI aumente y que sean más gases de los que el planeta pueda absorber, colocándose 40% por encima de los valores medios registrados (CICC, 2014), del cual la concentración del  $\text{CO}_2$  contribuye un 70% al aumento del efecto invernadero. Debido a esto, se han observado cambios en la atmósfera, entre los cuales se encuentran alteraciones en las zonas de vegetación, cambios en la cantidad y distribución de las precipitaciones, derretimiento de glaciares, aumento en el nivel del mar, aumento de la temperatura, etc. El  $\text{CO}_2$  liberado a la atmósfera por el consumo de energía proviene de todo tipo de actividades económicas, incluidos el transporte, el sector agropecuario, el comercio, el consumo del sector público y el doméstico, las actividades de generación de electricidad, de extracción de hidrocarburos, de refinación y otras actividades industriales.

Estudios recientes indican que México contribuye con alrededor del 1.67% (493 Millones de toneladas) de las emisiones de  $\text{CO}_2$ , de igual manera, lo señalan como un país vulnerable a sufrir mayor intensidad afectaciones ambientales derivadas del cambio climático (CFE, 2012).

Hoy en día existe el interés de realizar estudios y nuevas tecnologías que ayuden a la captura y reducción de las excesivas emisiones de  $\text{CO}_2$  generados. Dentro estas tecnologías está la captura de  $\text{CO}_2$  por medio de microorganismos fotosintéticos como las microalgas, las cuales toman el  $\text{CO}_2$  de la atmósfera como fuente de carbono para realizar el proceso de fotosíntesis para su crecimiento.

Esta propiedad de las algas puede utilizarse para capturar el CO<sub>2</sub> presente en los gases procedentes de la combustión. Las microalgas captan y almacenan carbono para su crecimiento proveniente del CO<sub>2</sub>, y posterior a esto lo convierten en oxígeno. Tienen elevadas tasas de crecimiento, llegando a doblar su población en aproximadamente de 24 a 48 horas (Plata *et al.*, 2009).

Existen distintos tipos de cultivos de la microalgas, estas pueden ser en sistemas abiertos o cerrados. La primera puede utilizar luz natural o artificial, requieres grandes áreas de cultivo, sin embargo, este método presenta ciertas desventajas, como las dificultades en el control de las condiciones de cultivo, evaporación del medio y la disminución de la intensidad de luz cuando se incrementa la profundidad (Benavente-Valdes *et al.*, 2012). Ahora los sistemas cerrados, llamados también fotobiorreactores son un sistema que proporciona un ambiente controlado y permite una alta productividad de microalgas. Estos facilitan el control de las variables ambientales de cultivo como la velocidad y suministro de CO<sub>2</sub> y nutrientes, la temperatura óptima de crecimiento, la exposición eficiente a la luz, la densidad de cultivo, los niveles de pH, agitación, etc. (Shabnam, 2015).

El propósito de este trabajo es la evaluación de las variables ambientales (Nutrientes, Luminosidad y CO<sub>2</sub>) de la microalga *Chlorella spp* con respectos a su densidad celular, carbohidratos, lípidos, proteínas y clorofilas, ya que esta puede obtener gran cantidad de biomasa y puede soportar niveles altos de estrés.

Así mismo para el cumplimiento de los objetivos específicos se presentará el diseño, construcción e implementación de un fotobiorreactor a escala piloto dentro del Instituto Tecnológico de Orizaba. La microalga *Chlorella spp* será puesta en crecimiento y se implementarán las variables recomendables obtenidas, evaluando a su vez la calidad de la biomasa y la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> obtenido en la digestión anaerobia.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar las condiciones recomendables de operación del proceso de fijación de CO<sub>2</sub> y su implementación en fotobiorreactores tubulares a escala piloto.

### Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las variables ambientales: luminosidad, nutrientes y CO<sub>2</sub> sobre la densidad celular, proteínas, carbohidratos, lípidos y clorofila.
- Diseñar un fotobiorreactor tubular airlift para el cultivo de microalgas a escala piloto
- Implementar las variables ambientales recomendables de operación en un fotobiorreactor tubular a escala piloto.
- Evaluar y caracterizar la biomasa obtenida y la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> en el fotobiorreactor tubular a escala piloto.



**CAPÍTULO 1**  
**FUNDAMENTOS TEÓRICOS**



## CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 1.1. Situación actual de las emisiones de CO<sub>2</sub> en México

México ocupa el undécimo lugar entre los países con mayores emisiones de Gases de Efecto Invernadero (CFE, 2012), comparado con los países industrializados sus emisiones son relativamente bajas con un valor de 705 Mton de CO<sub>2</sub>e, sin embargo, México contribuye con 1.67% del total de las emisiones anuales. Según (Semarnat, 2013) reportó que en México se emiten tan solo de CO<sub>2</sub> 492.3 Mton y dentro de los sectores que contribuyen en el inventario son: generación eléctrica; petróleo y gas; fuentes móviles de autotransporte y no carreteras; industria; agropecuario; uso del suelo, cambio de uso del suelo y silvicultura (USCUSS); residuos, residencial y comercial.

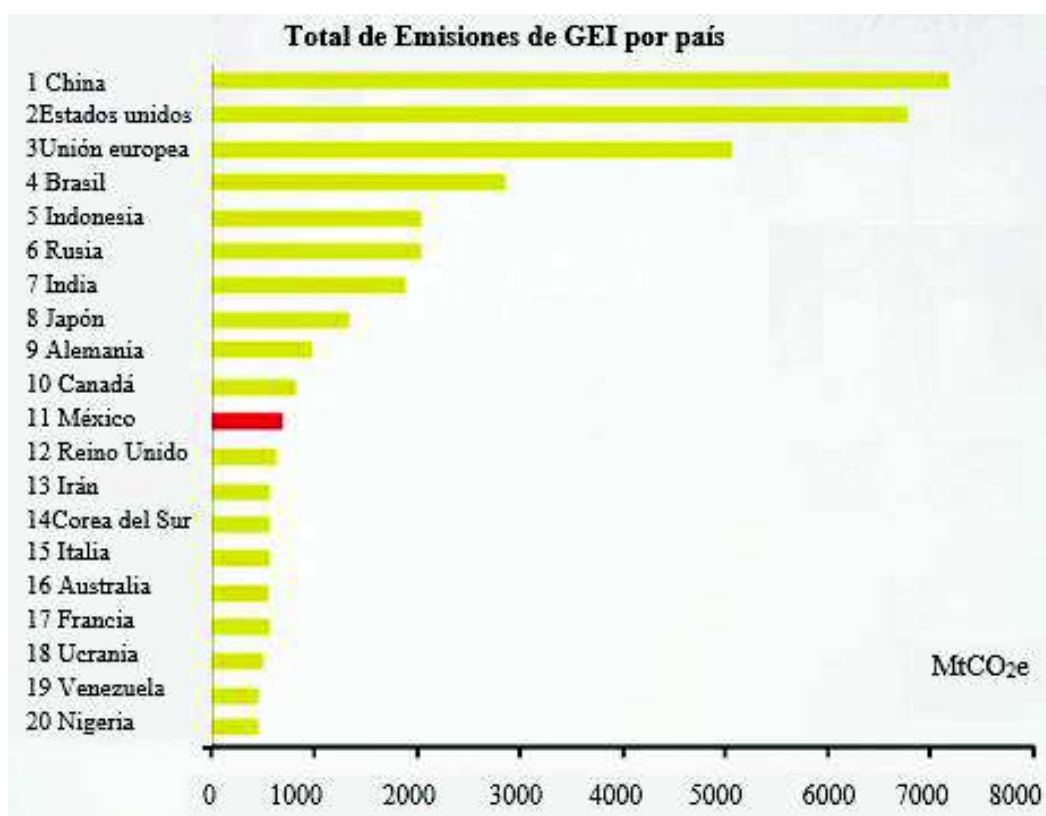


Figura 1.1 Principales países con mayor volumen de emisiones anuales de GEI a nivel mundial, expresado en Millones de toneladas de CO<sub>2</sub> (CFE y Secretaría de Energía, 2012).

Dentro de las emisiones de GEI y emisiones de CO<sub>2</sub> la Convención Marco de Naciones Unidas sobre Cambio Climático (CMNUCC, 2012) reportó que la contribución en México fue de 60 % en la producción y uso de combustibles fósiles, y de las emisiones de CO<sub>2</sub> fue del 75 %. Con esto se destacan las fuentes que mayormente generan emisiones de CO<sub>2</sub> como: la generación de electricidad que contribuyó con un 28%, la industria generadora de energía (extracción, refinación, etc.) con un 10% y la industria y otras actividades corresponden al 15 % restante (CFE, 2012).

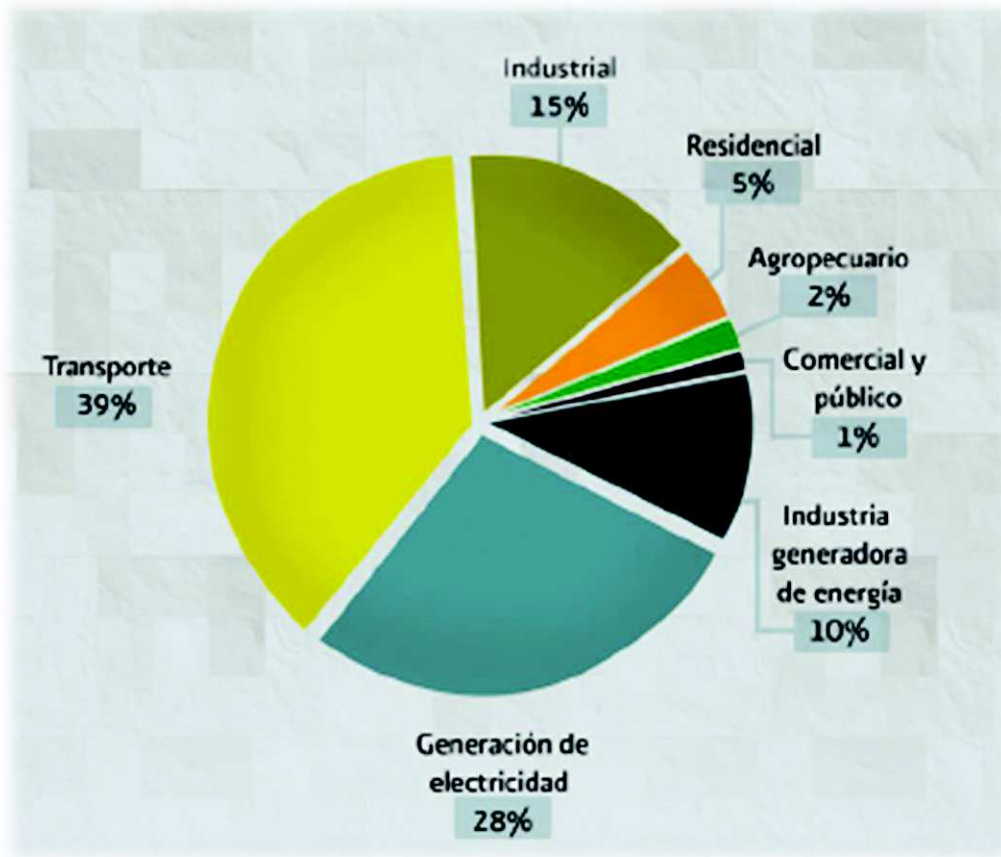


Figura 1.2 Emisiones de CO<sub>2</sub> por consumo energético por sector (*Secretaría de Energía y CFE, 2012*).

### 1.1.1. Digestión anaerobia y la producción de CO<sub>2</sub>

La digestión anaerobia consiste en la descomposición de material biodegradable en ausencia de oxígeno para dar como resultado el biogás (compuesto

mayoritariamente por un 60% de metano, 38% de CO<sub>2</sub> y trazas de otros gases) (Agroenfoque, 2012). Dentro de estos gases se encuentra también el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y varios hidrocarburos de menor importancia formados dentro de este mismo proceso.

El biogás producido a partir de la digestión anaerobia es considerado un combustible potencial para la generación de energía. Sin embargo la presencia de CO<sub>2</sub> reduce el poder calorífico y aumenta las emisiones de monóxido de carbono a la atmósfera y H<sub>2</sub>S trae como consecuencia la corrosión de motores, tuberías y estructuras de almacenamiento (Kao *et al.*, 2012).

El CO<sub>2</sub> es considerado el segundo gas que mayor se produce dentro del proceso de digestión anaerobia y su captura es esencial para aumentar la utilidad del biogás producido. En la actualidad existen diversas estrategias para el secuestro del CO<sub>2</sub> tales como los métodos físicos, químicos y biológicos.

### **1.1.2. Tecnologías para la captura y fijación de CO<sub>2</sub>**

La captura y fijación de CO<sub>2</sub> son una forma que podrían utilizarse para reducir las emisiones de la misma, provocadas por las actividades humanas. Esta podría aplicarse para aquellas emisiones que provengan de grandes centrales eléctricas o plantas industriales.

Dentro de las principales tecnologías para captura y fijación de CO<sub>2</sub> son las siguientes:

- Adsorción

La adsorción es un proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material, acumulándose dichas moléculas en una determinada superficie interfacial entre dos fases. El resultado es la formación de una película líquida o gaseosa en la superficie de un cuerpo sólido o líquido. La adsorción es considerada una opción atractiva para la captura CO<sub>2</sub>; sin embargo,

la captura eficiente de dicho gas requiere adsorbentes sólidos que presenten no solo una elevada capacidad de adsorción sino también una elevada selectividad para retener preferentemente CO<sub>2</sub> frente a otros gases (Vargas *et al.*, 2014).

- Separación de gases mediante membranas

Existen dos tipos de membranas que permiten separar el CO<sub>2</sub>: las membranas de separación de gases que permiten separar el CO<sub>2</sub> del resto de los componentes debido a su diferente permeabilidad a través del sólido poroso que constituye la membrana y las membranas de absorción de gases son aquellas que separan una corriente gaseosa de una líquida permitiendo el paso selectivo del CO<sub>2</sub> que se absorben en el líquido. La utilización de membranas requiere de inversiones grandes y produce una reducción de las eficiencias por lo que son necesarias las membranas capaces de operar a altas temperaturas (Becerra, 2010).

- Absorción

La separación de gases mediante procesos de absorción descansa en el principio de que diferentes especies de gases son capaces de pasar de la corriente de alimentación a la fase líquida del absorbente o disolvente. El líquido y los gases se ponen en contacto y, en función de la solubilidad de los componentes de los gases de alimentación, las tipologías de gases pueden ser absorbidos de manera selectiva por el disolvente líquido, mientras que el resto de gases de la corriente de alimentación atraviesan el disolvente y se emiten a la atmósfera. Al final del proceso, el disolvente, rico en CO<sub>2</sub>, se regenera mediante la aplicación de calor o presión, dependiendo del disolvente. El CO<sub>2</sub> capturado se separa del absorbente y se captura, mientras que el absorbente se recicla. La separación de dióxido de carbono por absorción puede alcanzarse mediante procesos de absorción física, química o híbridos.

- Separación criogénica

Los procesos de criogenización se han utilizado ampliamente para separar gases en corrientes de aire muy puras. La separación de CO<sub>2</sub> de otros gases implica una

alta presión, por encima de 5.1 atm, y muy baja temperatura, -56.6 °C. En consecuencia, se trata de un proceso intensivo en energía, con un consumo teórico de 1.9 kJ/kg de CO<sub>2</sub>.

- Carbonatación mineral

Especial interés está adquiriendo la tecnología de la adsorción química ya que permite capturar el CO<sub>2</sub> a través de la carbonatación, para luego mediante la calcinación obtener nuevamente el disolvente. El ciclo carbonatación - calcinación del CO<sub>2</sub> puede emplearse para la separación tanto en post-combustión como en precombustión. El mayor inconveniente de esta alternativa es que se requieren grandes cantidades de disolvente debido al proceso de degradación que se presenta durante el proceso de adsorción (Muñoz *et al.*, 2011).

- Captura de CO<sub>2</sub> mediante algas

Las algas, como cualquier otra especie vegetal, toman el CO<sub>2</sub> de la atmósfera para realizar el proceso de fotosíntesis para su crecimiento. Esta propiedad de las algas puede utilizarse para capturar el CO<sub>2</sub> presente en los gases procedentes de la combustión en una planta de generación eléctrica o una planta industrial (Kao *et al.*, 2012).

Esta tecnología consiste en el desarrollo de un Fotobiorreactor (FBR) que, a partir de aguas residuales y del CO<sub>2</sub> presente en los gases de salida, sea capaz de producir algas microscópicas que, tras un proceso de decantación y secado, se puedan utilizar como biocombustible en sustitución de combustibles fósiles. Los reactores industriales para cultivo de microalgas generalmente son estanques abiertos, fotobiorreactores y sistemas cerrados basados en placa tubular, plana u otros diseños. La producción de microalgas en sistemas cerrados como fotobiorreactores tiene un costo elevado. Sin embargo, los sistemas cerrados requieren mucho menos luz y para el cultivo de las microalgas (Muñoz *et al.*, 2011).

## 1.2. Algas

Son Organismos heterogéneos eucariotas capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. Estas presentan un variedad de formas, grupos y de tamaños, así mismo de estructura celular, metabolismo, composición química, ciclos de vida y hábitats. Presentan cloroplastos con clorofila donde se tiene la capacidad de capturar la energía luminosa como fuente de energía.

Las algas son plantas, principalmente acuáticas que viven tanto en agua dulce como en agua salada. Son organismos muy antiguos que prácticamente habitan en todos los ecosistemas del planeta, se consideran plantas talófitas, es decir, no poseen raíz, tallo y hojas (Salamanca, 2005); no desarrollan embrión, son organismos autótrofos, debido a que tienen la capacidad de sintetizar su propio alimento. Su diferencia de formas ha permitido clasificar las algas en diferentes grupos, de acuerdo a sus características estructurales como tipo de célula, de reproducción, de nutrición, de pigmentos, entre otros. Su sistema de clasificación varía según el autor, aunque se conocen tres grandes grupos de algas como son, las algas verdes (Chlorophyta), las algas rojas (Rhodophyta) y las algas pardas o café (Phaeophyta) mencionados por (Garibay-Hernández *et al.*, 2009) y (Villalobos-Zapata, 2010). Otro grupo de algas con características disímiles corresponde a las cianofíceas o algas azul-verdosas (Cyanophyta) la cual aunque es procariota, un tipo de bacteria, son considerados en este grupo artificial en términos de sus pigmentos y su función en el ecosistema (Graham y Wilcox, 2000) citado por (Aznar *et al.*, 2011).

### 1.2.1. Importancia económica de las algas

Las algas son un grupo de organismos con cuyos productos se tiene contacto cotidiano. Su importancia radica desde el consumo como alimentación hasta la obtención de compuestos para la industria. Dentro de la industria se pueden obtener yodo para productos farmacéuticos, potasa y sosa, y son ricas en compuestos de varios metales. Dentro de los principales productos obtenidos de algunas algas son los derivados de los componentes de la pared celular: los

alginatos, el agar, la carragenina y la diatomita. Los tres primeros son utilizados por su capacidad de hacer soluciones viscosas y gelatinizantes y la última como abrasivo y filtro. Los alginatos se obtienen de feofitas especialmente de aguas templadas y son utilizados en una gran variedad de productos (González, 1987):

En la siguiente tabla se presenta la importancia económica de las microalgas.

Tabla 1. 1 Importancia económica de las algas (González, 1987).

<b>Importancia negativa</b>	<b>Importancia positiva</b>
Interferencias en la industria de papel y pulpa por la formación de limos (baba)	Productos medicinales
Daños a humanos: alergias de la piel, enfermedades pulmonares y digestivas	Productos comerciales derivados de algas marinas y tierra de diatomeas
Muerte de seres humanos por ingestión de peces y mariscos envenenados	Alimento humano y para peces
Muerte de animales: efecto de toxinas en ganado vacuno, ovino, porcino, equino y aves de corral	Fijación de nitrógeno y acondicionamiento de suelo y su conservación
Obstrucción de filtros de agua	Índices en los niveles de contaminación
Putrefacción de aguas domésticas e industriales	Purificación de corrientes Industria petrolera
Parásitos en plantas: té, cítricos, plátano	Bioensayos en investigación sobre cáncer, limnológica y oceanográfica, paleontológica

Otra aplicación que también se le ha dado a las algas es en el tratamiento de las aguas negras para obtener aguas limpias y con bajo contenido de sales minerales antes de descargarlas en ríos o lagos. Dentro de esto, la acuicultura emplea el cultivo masivo de algas para la producción de especies comestibles y comerciales, tanto marinas como dulceacuícolas.

### **1.3. Microalgas**

Organismos fotosintéticos que poseen pigmentos y clorofilas que les permiten convertir la energía lumínica del sol en energía química y en oxígeno (Andersen, 2005). Tienen una alta capacidad para fijar el CO<sub>2</sub> y aprovechar la energía solar para producir biomasa. Así como son ubicuas, son el primer eslabón en la cadena trófica (Chisti, 2007). En comparación con otros organismos fotosintéticos superiores, las plantas poseen un alto grado de diferenciación; mientras que las microalgas, organismos eucariotas unicelulares con un tamaño aproximado de 5-50 µm y con diversas morfologías. Estas contienen pigmentos que dan colores variados como son la clorofila-a y la clorofila-b (color verdoso), la clorofila-c en algas pardas y diatomeas, la clorofila-d presente en algas rojas y algunos tipos de carotenoides como en el caso de las cianobacterias (Barsanti y Gualtieri, 2014).

Las microalgas tiene la capacidad de crecer en sistemas acuáticos de agua dulce y en agua salada. Así mismo el ambiente en que se desarrolle influye en su composición bioquímica. Estas están compuestas principalmente de proteínas, lípidos y carbohidratos que varía según el tipo de microalga, lo que las hace atractivas para diversos campos de aplicación (Barsanti y Gualtieri, 2014).

#### **1.3.1. Crecimiento**

Existe un patrón estándar de crecimiento de las microalgas y cianobacterias indicado por las siguientes fases (Romo-Piñera, 2002):

- **Lag o fase de adaptación:** En donde no ocurre incremento en el número de células, pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inóculo inicial.



- **Exponencial:** Ya una vez adaptadas al medio de cultivo, las microalgas comienzan a multiplicarse; puesto que la división da lugar a nuevas células que son capaces de dividirse, el aumento en número de microalgas se acelera continuamente en forma exponencial.
- **De declinación relativa de crecimiento:** En este caso, conforme el cultivo va creciendo se da una disminución de nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores como consecuencia del incremento de la población; de ahí que las microalgas disminuyan su tasa de división celular.
- **Estacionaria:** Ya no se aprecia una división celular neta, esto es que el número de células alcanzado se mantiene constante por cierto periodo de tiempo debido al balance entre la natalidad y la mortalidad que presenta la población en cultivo.
- **De muerte:** Las células pueden durar en la fase anterior semanas e incluso meses, aunque lo más normal es que comiencen a morir, es entonces cuando se presenta esta fase.

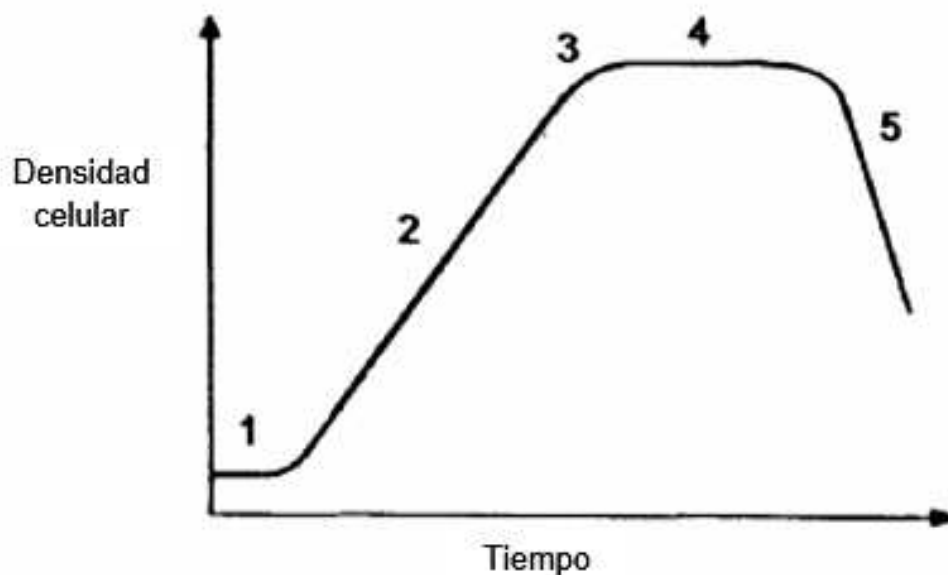


Figura 1.3 Curva representativa de crecimiento de un cultivo de microalgas en un volumen limitado (Romo-Piñera, 2002). 1. Fase de adaptación. 2. Fase de crecimiento exponencial. 3. Fase de declinación relativa de crecimiento. 4. Fase estacionaria. 5. Fase de muerte.

## 1.4. Condiciones ambientales para el crecimiento de las microalgas

Las microalgas siendo organismos fotosintéticos, requieren de ciertos parámetros que deben ser evaluados, determinados y medidos para que su crecimiento se realice con éxito. Dentro de los parámetros que se pueden considerar son los siguientes:

### 1.4.1. Luz

La intensidad lumínica es uno de los principales parámetros a considerar en un cultivo. La disponibilidad de luz determina la velocidad específica a la que se realiza la fotosíntesis y, como consecuencia, determina también la tasa específica de crecimiento. El crecimiento de las microalgas se incrementa conforme la intensidad de luz aumenta. Cuando la tasa de crecimiento llega a su punto máximo, ésta disminuye con el incremento de la intensidad de la luz debido a la fotoinhibición (Benavente-Valdes *et al.*, 2012). Existen dos tipos de iluminación: la natural, usando como fuente la luz solar y la artificial, usando lámparas de tungsteno o halógeno, diodos emisores de luz (LED), lámparas fluorescentes, fibra óptica y láser. La radiación lumínica en que las microalgas son capaces de realizar fotosíntesis y crecimiento celular está entre 400 y 700 nm (Ramírez-Mérida *et al.*, 2013).

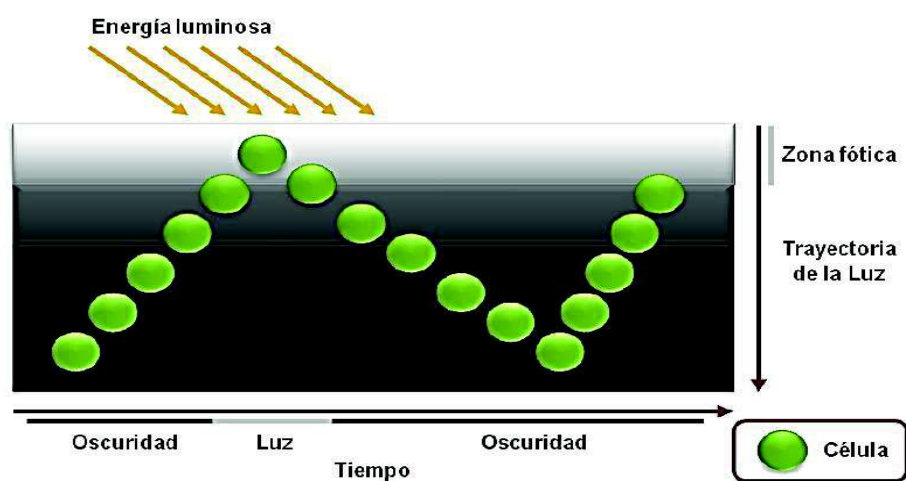


Figura 1.4 Trayectoria de la luz y de los ciclos luz/oscuridad (Contreras-Flores *et al.*, 2003) *modificado por Benavente-Valdés et al., 2012)*

(Lu y Vonshak, 1999) citados en (Contreras-Flores *et al.*, 2003) mencionan que en todos los sistemas de cultivo, las células más cercanas a la superficie iluminada impiden la penetración de la luz hacia el seno del medio de cultivo y producen un efecto de sombreado sobre las células más alejadas de la superficie (Figura 1.4). En algunos cultivos se ha estimado que la luz penetra solo de 1 a 2 mm más allá de la superficie, de manera que la zona fótica representa solo una pequeña fracción (10-30 %) del volumen total del cultivo.

#### **1.4.1.1. Ciclos de luz-oscuridad**

La energía luminosa administrada es necesaria para los procesos fotosintéticos. Estos procesos se pueden dividir en dos fases (Robles, 2003):

- Fase luminosa: en ella se generan los intermediarios que serán utilizados en la fase (ATP y NADPH) en la que las moléculas foto-receptoras, son las que atrapan la luz y están ubicados en las membranas tilacoidales.
- Fase oscura: El ATP y NADPH son utilizadas para formar los enlaces C-C de los carbohidratos, estas reacciones ocurren en el estroma, en los que se fija el CO<sub>2</sub> atmosférico gracias al ciclo de Calvin.

Los ciclos de luz-oscuridad son primordiales debido a que la concentración de las células cambia, a su vez los requisitos de luz también varían. Para esto el crecimiento de las microalgas está limitado por poca luz, pero un exceso puede provocar que sea venenoso. Los organismos fotoautótrofos deben recibir suficiente luz, superior a su punto de compensación para su crecimiento neto, la insuficiente división de las células, resta al crecimiento neto del cultivo debido a la pérdida respiratoria (Radmer *et al.*, 1987).

El aumento de la luz más allá de la compensación da como resultado un aumento en la tasa de crecimiento, hasta que el cultivo se sobresature de luz y conforme aumenta la intensidad, puede provocar efectos de fotoinhibición por exceso de luz (Nilsen y Orcutt, 1996). Si la iluminación es constante, la intensidad fotosintética aumenta con la concentración de CO<sub>2</sub> en el medio,

debido a que a mayor concentración de  $\text{CO}_2$  mayor será la velocidad a la que la ribulosa-difosfato-carboxilasa fijará el  $\text{CO}_2$  en el ciclo de Calvin.

La intensidad de la iluminación aumenta el rendimiento de la fotosíntesis, cuantos más fotones de luz lleguen a los fotosistemas, más cantidad de ATP y NADPH, y como consecuencia más  $\text{CO}_2$  se podrá fijar en la fase oscura. Si la concentración de  $\text{CO}_2$  es muy baja, la iluminación no influenciará en gran medida sobre la intensidad fotosintética ya que no hay suficiente  $\text{CO}_2$  para fijar en la fase oscura. Sin embargo, a partir de un cierto valor en la concentración de  $\text{CO}_2$ , la intensidad de iluminación se convierte en un factor limitante para el proceso fotosintético (Figura 1.5) (Bionova, 2007).

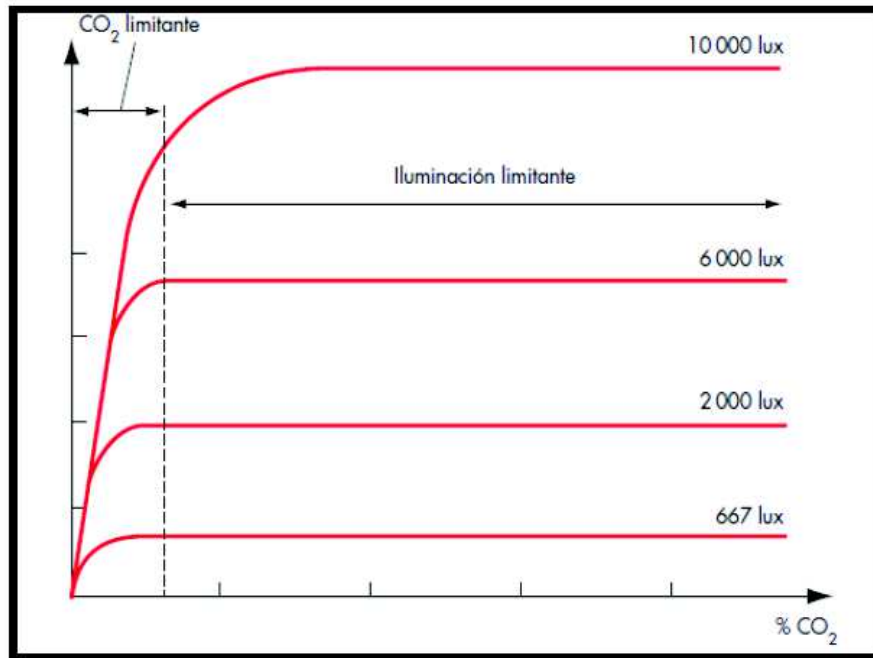


Figura 1.5 Concentración de  $\text{CO}_2$  e iluminación durante el anabolismo (Bionova, 2009)

El flujo de luz es medido en lumen (lm); la intensidad de la iluminación se expresa en lux ( $\text{lm}\cdot\text{m}^{-2}$ ).

#### 1.4.2. Temperatura

La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie. Por encima de esta, aumenta la

respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global. La temperatura óptima para el cultivo de microalgas se encuentra generalmente entre los 20 y 24 °C, no obstante, estas pueden variar dependiendo del medio de cultivo, la especie y la cepa utilizada. Los cultivos de microalgas toleran temperaturas de entre 16 y 27 °C, en donde a temperaturas menores a 16 °C disminuyen el crecimiento, mientras que una temperatura mayor a los 35 °C resulta ser letal para un gran número de especies (Benavente-Valdes *et al.*, 2012).

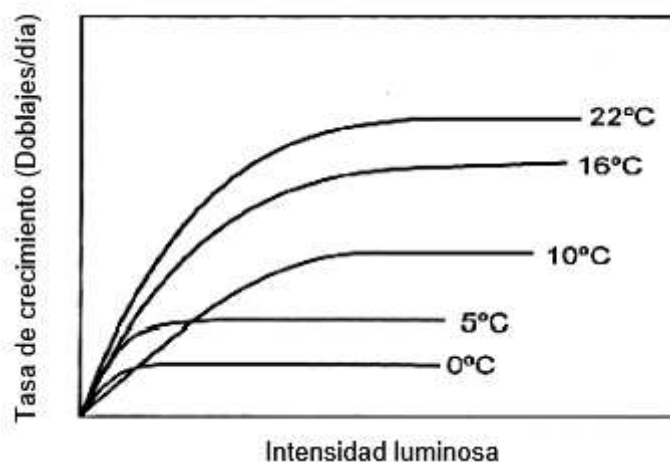


Figura 1.6 Tasa de crecimiento en función de la intensidad luminosa a distintas temperaturas (Abalde *et al.*, 1995), citados por (Plasencia, 2012).

De acuerdo con (Abalde *et al.*, 1995) citados por (Plasencia, 2012) existe un nivel de iluminación óptimo para cada temperatura de cultivo como se muestra en la Figura 1.6.

### 1.4.3. Agitación

La agitación asegura la distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, dejándolos disponibles para su mejor aprovechamiento, mejora la distribución de luz a las células, asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas, evitando que se sedimenten y previene una estratificación térmica (Romo, 2001).

En cultivos pequeños o escala, la agitación puede complementarse con la adición de CO<sub>2</sub> para lograr la agitación y enriquecer el cultivo con más carbono para el metabolismo celular.

#### 1.4.4. pH

La medida del pH se ve influenciada por varios factores como pueden ser: la productividad algal, la respiración, la alcalinidad y la eficiencia del sistema de adición de CO<sub>2</sub>. La medición del pH puede convertirse en una evaluación cuantitativa de la cantidad de biomasa en el medio. A mayor biomasa, mayor degradación de bicarbonato y por consiguiente se eleva la concentración de grupos hidroxilos en el medio, aumentándose así el pH (Rodríguez y Triana, 2006), así también apreciado en la Figura 1.7. Cada una de las especies de microalgas tiene requerimientos necesarios de pH para que permita un crecimiento óptimo. A niveles de pH alcalinos, la disponibilidad de CO<sub>2</sub> puede ser limitante para el crecimiento y la fotosíntesis de microalgas. El rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7.

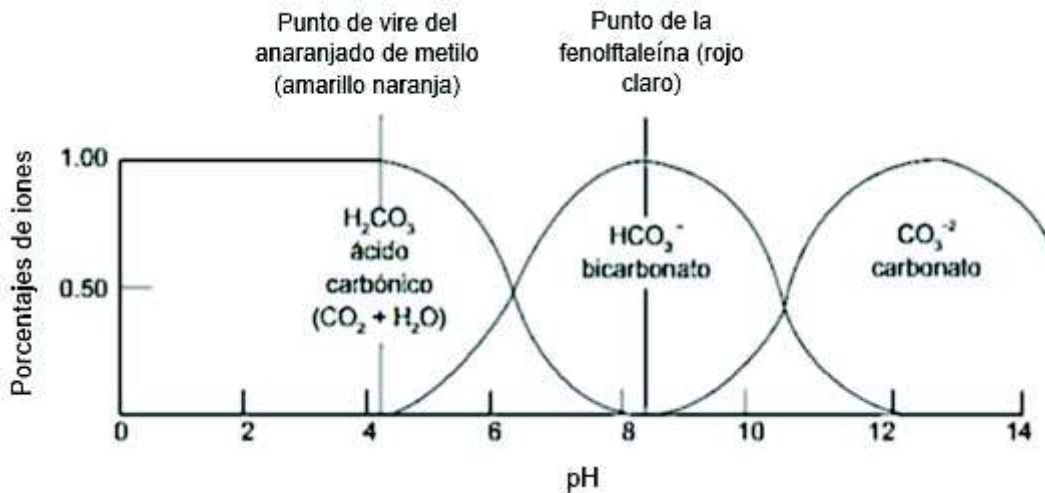


Figura 1.7 Dependencia del pH de las especies químicas del sistema carbonato (Cortijo, 2013)

Un pH óptimo en el cultivo generalmente es mantenido gracias a la aeración con aire enriquecido con CO<sub>2</sub> (Benavente-Valdés *et al.*, 2012). En el caso de los cultivos de alta densidad celular, la adición de dióxido de carbono corrige un incremento del pH, el cual puede llegar a un valor límite de 9 para el crecimiento de la microalga.

#### **1.4.5. Nutrientes**

El CO<sub>2</sub> es la fuente de carbono más utilizada en cultivos de microalgas junto con el Nitrógeno (Hernández y Labblé, 2014). Al consumirse el carbono, el oxígeno es producido por fotólisis del agua y este es diluido en el medio de cultivo (Benavente-Valdés *et al.*, 2012).

Las microalgas, requieren para su crecimiento macronutrientes, que son utilizados para sintetizar compuestos orgánicos y micronutrientes. Éstos son utilizados como catalizadores; el desbalance entre la proporción se manifiesta como un descenso del crecimiento o hasta la detención del mismo. Otras sustancias requeridas son las vitaminas entre las que se encuentran la tiamina (B1), cianocobalamina (B12), y biotina (B6).

#### **1.4.6. Dióxido de carbono**

La fijación biológica del CO<sub>2</sub> puede llevarse a cabo por plantas superiores y microalgas, sin embargo las microalgas poseen una mayor capacidad de fijar CO<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> puede provenir de diversas fuentes: CO<sub>2</sub> atmosférico, de las industrias, de los gases de escape como son gases de combustión.

Estudios han demostrado que una aireación rica en CO<sub>2</sub> provee este gas en mayor cantidad a las microalgas incluso el doble (Hernández y Labblé, 2014), lo que desoxigena el medio y evita la fotooxidación. La concentración óptima de CO<sub>2</sub> para la producción de microalgas en fotobiorreactores, ha mostrado que el uso de aire enriquecido con 5 o 10 % (v/v) de CO<sub>2</sub> a una velocidad de 0.025 vvm (volumen de aire por volumen de trabajo por tiempo) es efectivo para el cultivo de biomasa (Benavente-Valdés *et al.*, 2012).

### 1.5. Microalga *Chlorella spp*

El nombre *Chlorella* proviene del griego *Chloros*, que significa verde, y del latín *ella*, que significa cosa pequeña, y fue descubierta y nombrada por el Holandés M.W. Beyerinck en 1890 (Camacho-Quezada *et al.*, 2009).

Tabla 1. 2 Clasificación científica del género *Chlorella* (Sistema de información de biodiversidad, 2014)

<b>Reino:</b>	<i>Plantae (Primoplantae)</i>
<b>División:</b>	<i>Chlorophyta</i>
<b>Clase:</b>	<i>Trebouxiophyceae</i>
<b>Orden:</b>	<i>Chlorellales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Chlorellaceae</i>
<b>Género:</b>	<i>Chlorella</i>

Tabla 1. 3 Características de la microalga *Chlorella spp*. (Adaptado de Arrúe-Zúñiga, 2013 y Alvear-Alayón *et al.*, 2011)

<b><i>Chlorella spp</i></b>	
Temperatura máxima tolerable (°C)	40 °C
Concentración máxima de CO <sub>2</sub> tolerada (v/v)	40%
Productividad volumétrica de biomasa ( <i>mg · L · día<sup>-1</sup></i> )	25-250
pH	7-9
Tiempo de duplicación (día)	2.34

El género *Chlorella*, encierra un conjunto de algas verdes que poseen la capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis, producir azúcares a partir del CO<sub>2</sub> y luz solar como fuente de energía. Este género está conformado por alrededor de 10 especies genéticamente clasificadas. Estas células tienen un diámetro aproximado de 2-12 µm de forma esféricas o elipsoidal encontradas en lagos y pantanos de todo el mundo. *Chlorella* pertenece a la división *Chlorophyta* y a la clase de las



*Trebouxiophyceae* (Tabla 1.2) (Infante *et al.*, 2012). Esta microalga apareció en la Tierra hace aproximadamente 1.5 o 2 mil millones de años y fue una de las primeras formas vegetales con un núcleo bien definido, según muestran fósiles datados del período precámbrico (Camacho-Quezada *et al.*, 2015). En su composición tiene un alto contenido de clorofilas y esta se multiplica con gran rapidez, llegando hasta dividirse en cuatro células cada veinte horas. En la Tabla 1.3 se muestran algunas características más importantes de la microalga.

*Chlorella* tiene la capacidad de crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas. Cabe mencionar que aparte de los cultivos en condiciones autotróficas, los cultivos heterotróficos son también cultivados. *Chlorella* es la especie más importante en la industria de las microalgas, es cultivada y vendida esencialmente como suplemento alimenticio (Richmond, 2004).

#### **1.5.1. Aprovechamiento**

Las aplicaciones que se le ha dado al género *Chlorella* han sido ampliamente estudiadas; debido a su composición estructural y los metabolitos que esta produce, entre las aplicaciones más relevantes se tienen:

- Como materia prima para la elaboración de combustibles

*Chlorella spp*, posee la capacidad de producir grandes cantidades representativas de lípidos (hasta el 40% dentro de la estructura microalgal), estos lípidos están compuestos por ácidos grasos poli-insaturados, que son de gran utilidad como materia prima para la elaboración de biodiesel (Shen-Yi *et al.*, 2011).

- Como medicina y suplemento nutricional

Ha sido administrada como medicina, estas mejoran el desempeño del sistema inmunitario y adicionalmente, sirven como suplemento nutricional siendo fuente de proteínas, lípidos y carbohidratos. (González-Delgado, 2009).

- Como método de biorremediación

Así mismo ha sido estudiada en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas, ya que estas poseen la capacidad de remover cantidades significativas de N y P durante su crecimiento, así mismo las microalgas pueden absorber metales y aceleran los procesos de inactivación de bacterias patógenas (Chacón, 2004).


### 1.6. Sistemas de cultivo para las microalgas

Existen dos diseños básicos (Contreras-Flores *et al.*, 2003): los cultivos abiertos, donde la biomasa está expuesta a las condiciones medioambientales; y cerrados, denominados fotobiorreactores o PBR (por sus siglas en inglés), con poco o ningún contacto con el medio externo.

#### 1.6.1. Comparación de sistemas de cultivo



La Tabla 1.4 muestra una comparación entre los fotobiorreactores (tubular, paneles y columna) y los sistemas abiertos ajustada por Dragone *et al.*, 2010 donde muestra las ventajas y limitaciones de los mismos para diferentes condiciones de cultivo y parámetros de crecimiento.

Tabla 1. 4 Ventajas y limitaciones de varios sistemas de cultivo de microalgas (Dragone *et al.*, 2010).

Sistema de cultivo	Ventajas	Limitaciones
<p><b>Sistema abierto</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Relativamente económico</li> <li>✓ Fácil de limpiar</li> <li>✓ Fácil mantenimiento</li> <li>✓ Bajo consumo de energía</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los cultivos se contaminan fácilmente</li> <li>• Poco control de las condiciones de cultivo</li> <li>• Bajo en mezclado, luz y consumo de CO<sub>2</sub></li> </ul>

Siguiente

Continuación de Tabla 1.4 Ventajas y limitaciones de varios sistemas de cultivo de microalgas (Dragone *et al.*, 2010).

Sistema de cultivo	Ventajas	Limitaciones
<p><b>Fotobiorreactor tubular</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Relativamente barato</li> <li>✓ Gran superficie de iluminación</li> <li>✓ Adecuado para cultivos al aire libre</li> <li>✓ Buena productividad de biomasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gradientes de pH, oxígeno disuelto y CO<sub>2</sub> a lo largo de los tubos</li> <li>• Cierta grado de crecimiento en la pared</li> <li>• Requieren un amplio espacio para operar</li> <li>• Fotoinhibición</li> </ul>
<p><b>Fotobiorreactor de panel</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Relativamente barato</li> <li>✓ Fácil de limpiar</li> <li>✓ Gran superficie de iluminación</li> <li>✓ Bajo consumo de energía</li> <li>✓ Buena productividad de biomasa</li> <li>✓ Adecuados para cultivos al aire libre</li> <li>✓ Bajo nivel de acumulación de oxígeno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dificultad para escalar</li> <li>• Difícil control de temperatura</li> <li>• Un cierto grado de crecimiento en la pared</li> <li>• Estrés hidrodinámico en algunas cepas de microalgas</li> <li>• Baja eficiencia fotosintética</li> </ul>

Siguiente

Continuación de Tabla 1.4 Ventajas y limitaciones de varios sistemas de cultivo de microalgas (Dragone *et al.*, 2010).

**Fotobiorreactor de columna**



- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>√ Bajo consumo de energía</li> <li>√ Buen mezclado</li> <li>√ Alta eficiencia fotosintética</li> <li>√ Mejor exposición a los ciclos de luz-obscuridad</li> <li>√ Fotoinhibición reducida</li> <li>√ Reducción de la fotoinhibición</li> <li>√ Fácil esterilizar</li> <li>√ Foto-oxidación reducida</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pequeña superficie de</li> <li>• Disminución del área superficial iluminada al escalar</li> <li>• Caro comparado con los estanques abiertos</li> <li>• Costos de mantenimiento de iluminación</li> <li>• Materiales de construcción sofisticados</li> <li>• Escalabilidad modesta</li> <li>• Cierta grado de crecimiento en la pared</li> </ul> |
|---|--|

**1.6.2. Fotobiorreactores con microalgas**

Un fotobiorreactor puede ser definido como un contenedor o recipiente biológico artificial en el cual se pretende obtener las condiciones ambientales internas capaces de permitir que los microorganismos, células o tejidos fotosintéticos en el contenedor puedan crecer, desarrollarse y realizar sus funciones metabólicas en presencia de luz (Acuña, 2011).

Para la obtención de microalgas, los fotobiorreactores se usan principalmente con el fin de fijar CO<sub>2</sub>, aumentando la producción de la biomasa mediante la fotosíntesis. Estas microalgas al ser organismos fotoautotrófos, fijan el CO<sub>2</sub> que se ha administrado a través de flujos de CO<sub>2</sub> inyectado directamente en un medio de cultivo enriquecido con (N) y (P) (Fernández *et al.*, 2014).

Los sistemas cerrados son generalmente más costosos de construir y automatizar, permiten el trabajo con un volumen de cultivo no muy grande, inferior a los sistemas abiertos, a pesar de ello los sistemas cerrados constituyen sistemas altamente intensificados con diversidad de diseños y con los que se pueden obtener altos rendimientos en la producción de biomasa. Algunos modelos permiten incluso el control absoluto sobre las variables primordiales en un cultivo microalgal como la luz, el pH y la temperatura (Shabnam, 2015).

El cultivo en fotobiorreactores permite mejorar notablemente la densidad celular, la productividad y con esto la economía de los cultivos. Implica que el aprovechamiento de la energía luminosa sea maximizada (Contreras-Flores *et al.*, 2003).

### **1.6.3. Fotobiorreactores airlift**

Los reactores tipo airlift son una variación de los reactores tubulares. La principal diferencia entre los reactores airlift y las columnas de burbujeo radica en el tipo de flujo del fluido o mezcla gas-líquido. En una columna de burbujeo o también reactor tubular, no se controla la interacción entre el gas y el líquido (Morales-López, 2009). Por el contrario en los reactores tipo airlift separan físicamente los flujos ascendentes de los descendentes y existe mayor control entre la interacción gas-líquido. Los biorreactores airlift cuentan con estructuras bien definidas (Fernández, 2013):

- Columna de burbujeo (*riser* o *upflow*): guía las burbujas hacia el separador de gases. En ella el flujo es ascendente.

- Columna de flujo descendente (*Downcomer* o *downflow*): en esta parte no hay burbujas y se establece un flujo descendente debido a una mayor densidad aparente en el *riser*.
- Separador de gases: está ubicado en la parte superior del biorreactor, en esta parte ocurre la separación de las burbujas que llegan por el *riser*, donde posterior se une con el *downcomer*.
- Base: es la parte inferior del biorreactor, parte donde se unen el *riser* y el *downcomer*. En esta parte se introducen las burbujas por el *riser*.

El *riser*, separador de gases, el *downcomer* y la base enmarcan una continua corriente de mezclado. En la Figura 1.8 se nombran las partes de un a) Airlift tubular de *riser* concéntrico y otro b) con *downcomer* concéntrico.

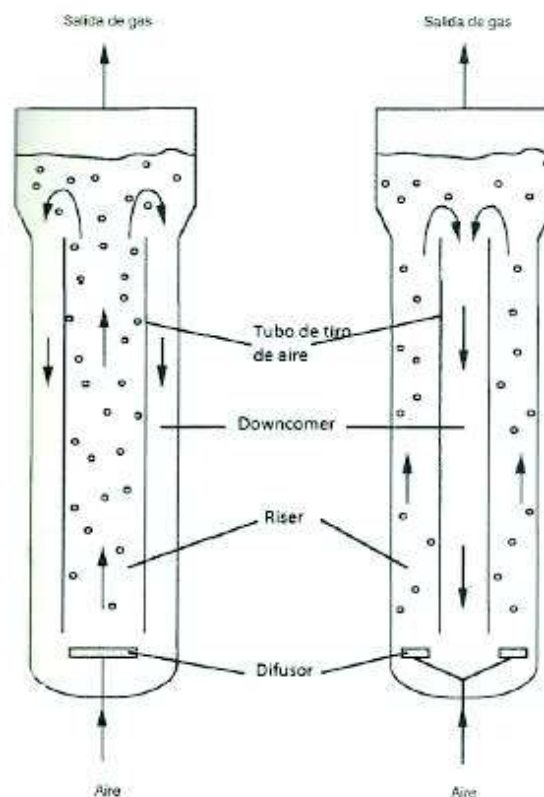


Figura 1.8 Partes características de un biorreactor airlift (Doran, 1998 citada por Fernández, 2013)

Los biorreactores airlift pueden ser de circulación interna o externa. El primero poseen un tubo colocado en el interior del tanque donde delimita las dos zonas (airlift de tubos concéntricos), también puede estar separado verticalmente por un baffle (airlift de cilindro seleccionado). En la Figura 1.9 se muestra las vistas superiores de las distintas configuraciones de los biorreactores airlift (Guevara-López, 2008).

Este tipo de biorreactores han sido utilizados en diversas áreas, como en el cultivo de células bacterianas y levaduras, fermentaciones con hongos, cultivo de células animales y vegetales, tratamientos de aguas residuales y cultivo de microalgas Morales-López, 2009; Sousa *et al.*, 2013; Fernández, 2013.

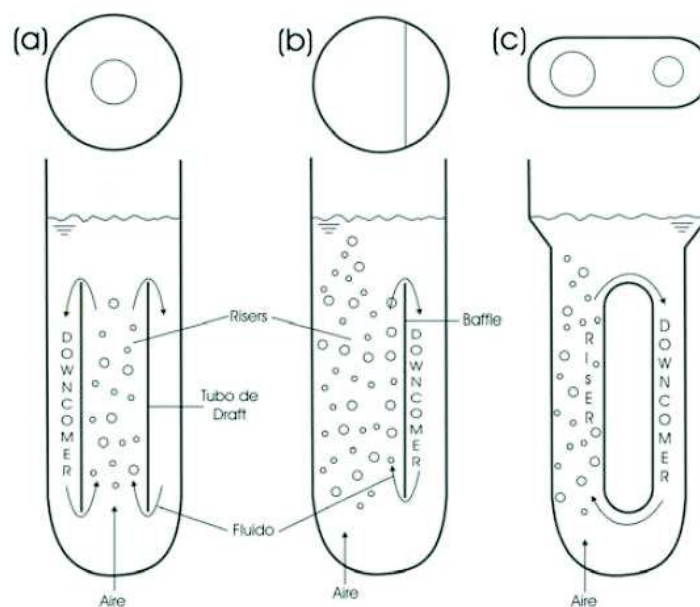


Figura 1.9 Configuraciones de biorreactores airlift. a) Airlift de tubos concéntricos, b) Airlift de cilindro seleccionado y c) Airlift de recirculación externa. Tomado de Chisti y Moo-Young, 2002; Fernández, 2013.

### 1.6.3.1. Ventajas y desventajas de los biorreactores airlift

Dentro de las ventajas que se pueden mencionar son numerosas, entre las que se pueden mencionar son las siguientes:

- Débiles fuerzas de cizalla en su interior al remplazar una agitación mecánica por una neumática. Esta cualidad ha sido aprovechada para cultivar células o tejidos frágiles que se estropearan en reactores agitados con aspas.
- Su diseño no involucra ejes o motores eléctricos por lo que su construcción es sencilla, robusta, de fácil mantenimiento y gran eficiencia energética.
- El burbujeo de aire a través del medio líquido facilita la transferencia de masa, enriqueciendo el medio con algún gas o por lo contrario despojándolo de gases residuales de reacción (Fernández, 2013).

Así mismo estos biorreactores no son recomendables cuando el medio del cultivo es muy viscoso o contienen partículas sólidas muy densas. En esto mismo depende mucho la construcción y los accesorios, así mismo pueden o no esterilizarse (Jiménez y Rojas, 2011).

#### **1.6.4. Materiales de construcción**

Los fotobiorreactores se deben fabricar con materiales de construcción que cumplan con características de alta transparencia, flexibilidad, durabilidad, toxicidad nula, resistencia a los productos químicos, resistencia a la intemperie y bajo costo.

Entre los principales materiales de construcción, se pueden considerar: el acrílico, el polietileno y el vidrio flotado. (Conde *et al.*, 2013) compara estos tres materiales debido al efecto sobre el medio de cultivo y el crecimiento de la biomasa los cuales son: el calor específico, la conductividad térmica, transmisión de luz, la energía retenida en las paredes del material. La Tabla 1.5 muestra las propiedades de cada uno de los materiales:



Tabla 1. 5 Propiedades de materiales para construcción de fotobiorreactores (Conde *et al.*, 2013).

<b>Propiedad</b>	<b>Acrílico rígido</b>	<b>Polietileno de alta densidad</b>	<b>Vidrio flotado</b>
Calor específico (J/kg K)	1465	2936.7	750
Conductividad térmica (W/m K)	0.18	0.29	1
Transmisión de luz (%)	92	80	90
Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	1180	(940-965)	2500
Energía retenida (MJ kg m <sup>-1</sup> )	13.5	72.8	15.9

### 1.7. Parámetros de diseño de un fotobiorreactor

De acuerdo con (Acuña, 2011), los parámetros básicos que deben ser controlados para el diseño son:

- La dinámica de fluidos (Burbujeo, agitación, caudal de recirculación)
- La densidad celular, temperatura, pH, salinidad
- Fuentes de flujo lumínico homogéneo de alto rendimiento y bajo consumo
- Geometría, fácil limpieza y cosecha de las microalgas
- Automatización de sistema de flujo de gases (Aire, CO<sub>2</sub>)
- Cantidad y calidad de nutrientes necesarios
- Fisiología, bioquímica y biología de la microalga

### 1.7.1. Similitudes influyentes en los sistemas

De acuerdo con (Bailey y Ollis, 1986) hace mención de las similitudes influyentes en los sistemas, como pueden ser:

- Similitud geométrica: las razones que relacionan las formas, longitudes y volúmenes de los contenedores deben ser iguales.
- Similitud cinemática: razón entre las velocidades, en este caso las velocidades de crecimiento en ambos sistemas.
- Similitud dinámica: la razón de proporcionalidad entre fuerzas que influyen sobre el los sistemas  $K_{La}$ , potencia e iluminación, etc.

La similitud geométrica es primordial para el escalamiento dado a que esto permite obtener idea de las razones de proporcionalidad que pudiesen afectar el cultivo escalado. La escala de proporcionalidad  $n_L$  es un parámetro que normalmente se calcula entre las longitudes verticales de los recipientes a ser usados como referencia. Esta relación de proporcionalidad es un modelo matemático aplicado a semejanzas geométricas como se muestra en la ecuación 1.4

$$n_L = \frac{L_m}{L_p} \quad (1.4)$$

Donde:

L = Longitud (Horizontal o vertical)

L<sub>m</sub> = Longitud del modelo

L<sub>p</sub> = Longitud del prototipo

Las similitudes cinemáticas y dinámicas se van estableciendo en las primeras etapas en lo que se desarrollan los métodos y se establecen para la producción de microorganismos.

### 1.8. Hidrodinámica de cultivos microalgales

La circulación es muy importante para garantizar una óptima iluminación de las algas, un intercambio gaseoso adecuado, así como su temperatura y su pH. Si se basa en el principio de reactores airlift o los de columnas de burbujeo, el cual tiene un sistema interno o externo que permite mezclar y la circulación de los fluidos son el resultado de las corrientes de aire introducido mediante la creación de las diferencias en la densidad del agua en varias regiones del fotobiorreactor (Jutglar, 2005). Los tipos de fluidez son los siguientes:

- El régimen homogéneo que se genera mediante bajas velocidades superficiales del gas (aproximadamente debajo de 5cm/s), en esta se crean burbujas con un tamaño relativamente pequeño que tienden a ascender, lo que permite una distribución suave y uniforme de las burbujas en la columna.
- El régimen heterogéneo, se genera mediante altas velocidades superficiales del gas, por arriba de 5 cm/s. Es desequilibrada comparado con el sistema homogéneo, esta presenta un movimiento turbulento y forma grandes burbujas de poca duración.

Los tamaños de burbuja pueden ser distinguidos de acuerdo con la velocidad que se suministre el gas, al igual que el área por donde transcurre el mismo. En la Figura 1.10 se visualiza los dos tipos de régimen:

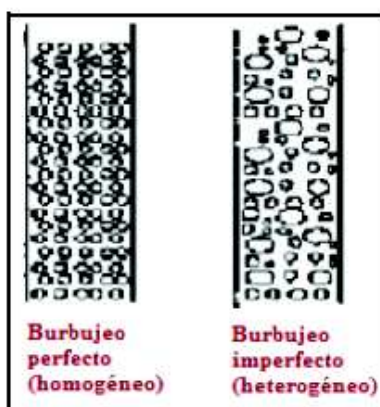


Figura 1.10 Régimen de flujo homogéneo y heterogéneo

Las microburbujas son esenciales y de vital importancia para la realización de procesos fotosintéticos a través del suministro de CO<sub>2</sub> presente en el aire. Según (Zimmeran, 2011) reportó que las microburbujas tienen una superficie mucho más amplia de contacto en relación al volumen de burbujas más grandes producidas por los sistemas de aireación convencionales. Esta característica es aprovechable para aumentar la transferencia de masa durante el contacto directo que existe entre el gas y el líquido.

### **1.9 Importancia del secuestro de CO<sub>2</sub>**

El rápido desarrollo de las actividades humanas ha traído consigo una grave problemática causada por el aumento de la demanda energética mundial, el agotamiento de los combustibles fósiles y el impacto ambiental causado por el aumento de los gases de invernadero y el calentamiento global (Garibay-Hernández *et al.*, 2009). Los GEI son indispensables en la atmosfera para mantener la temperatura promedio de la tierra, pero el aumento excesivo de dichos gases, en especial el CO<sub>2</sub> ha causado cambios climáticos notorios. Teniendo en cuenta que en la actualidad la mayor proporción de GEI presente en la atmosfera es de CO<sub>2</sub> y además dicho gas es indispensable para el proceso de fotosíntesis que llevan las plantas y seres vivos, por lo cual la importancia del secuestro de CO<sub>2</sub> radica en reducir las altas concentraciones y utilizarlo como fuente de carbono para microorganismos, plantas y otros seres vivos.

La necesidad de capturar el CO<sub>2</sub> se vuelve uno de los principales objetivos, por lo cual se buscan tecnologías limpias, orientadas al cuidado del medio ambiente que faciliten la reducción, captura y fijación de CO<sub>2</sub> (Muñoz *et al.*, 2011).

### **1.10 Estudios de los procesos biológicos de secuestro de CO<sub>2</sub> para la depuración de corrientes**

En la actualidad existen pocos estudios orientados al secuestro de CO<sub>2</sub> utilizando procesos biológicos con la finalidad de ser amigables al medio ambiente. Estos estudios han utilizado organismos microscópicos como las microalgas que son capaces de capturar o biofijar CO<sub>2</sub> y en corrientes de biogás.

Dentro de los estudios se encuentra el realizado por (Jacobo-Lopes, 2009) quien evaluó el efecto de los fotoperiodos sobre la producción de biomasa y la velocidad de fijación de CO<sub>2</sub> utilizando un fotobiorreactor de columna y la microalga *Aphanothece microscópica Nägeli*. Utilizando concentraciones por arriba de 15% v/v CO<sub>2</sub> y flujos de aire enriquecido de CO<sub>2</sub>.

Otro de los estudios utilizando procesos biológicos, es el realizado por Cheng *et al.*, 2006 quienes construyeron una membrana fibrosa en un fotobiorreactor que fue utilizada para la fijación de CO<sub>2</sub> y remover las concentraciones suministradas de 1% v/v CO<sub>2</sub> esterilizado antes de ser suministrado y utilizando la microalga *Chlorella vulgaris*. Siendo una alternativa prometedora,

También (Sumardiono *et al.*, 2013) utilizaron la cianobacteria *Spirulina Platensis* evaluando el suministro de biogás como fuente provisora de CO<sub>2</sub>. Ellos evaluaron dos formas: el aire directamente y el aire con biogás, obteniendo que con el biogás hubo un decremento en el pH. A su vez evaluaron el modelo de cinética de crecimiento utilizando la ecuación modificada de Gompertz. El biogás utilizado contenía un 42.37% de CH<sub>4</sub>, 48.97% CO<sub>2</sub> y 1.92% CO y otros gases.

Estos aspectos son esenciales para esta investigación ya que en la actualidad las emisiones de CO<sub>2</sub> son de las principales problemáticas que enfrentamos lo cual necesitamos tecnologías innovadoras y prometedoras que ayuden a la sustentabilidad de los recursos que aun poseemos y a la preservación de dichos recursos para futuras generaciones. Por lo tanto, la finalidad de cada uno de los aspectos teóricos mencionados en este capítulo son el de enriquecer y contribuir a esta investigación sustentando cada uno de los métodos utilizados y la comparación de los resultados obtenidos.



**CAPÍTULO 2**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se describe la metodología que se empleará para el desarrollo de este trabajo de investigación, la cual se dividió en 5 etapas, que se describen en la Figura 2.1 y se pueden numerar de manera general de la siguiente forma:

- I. Evaluación de las variables ambientales: Luminosidad, nutrientes y CO<sub>2</sub>
- II. Diseño de un fotobiorreactor tubular a escala piloto
- III. Montaje del fotobiorreactor en plantas piloto
- IV. Implementación de las variables recomendables a escala piloto
- V. Evaluación y caracterización de la biomasa producida a escala piloto

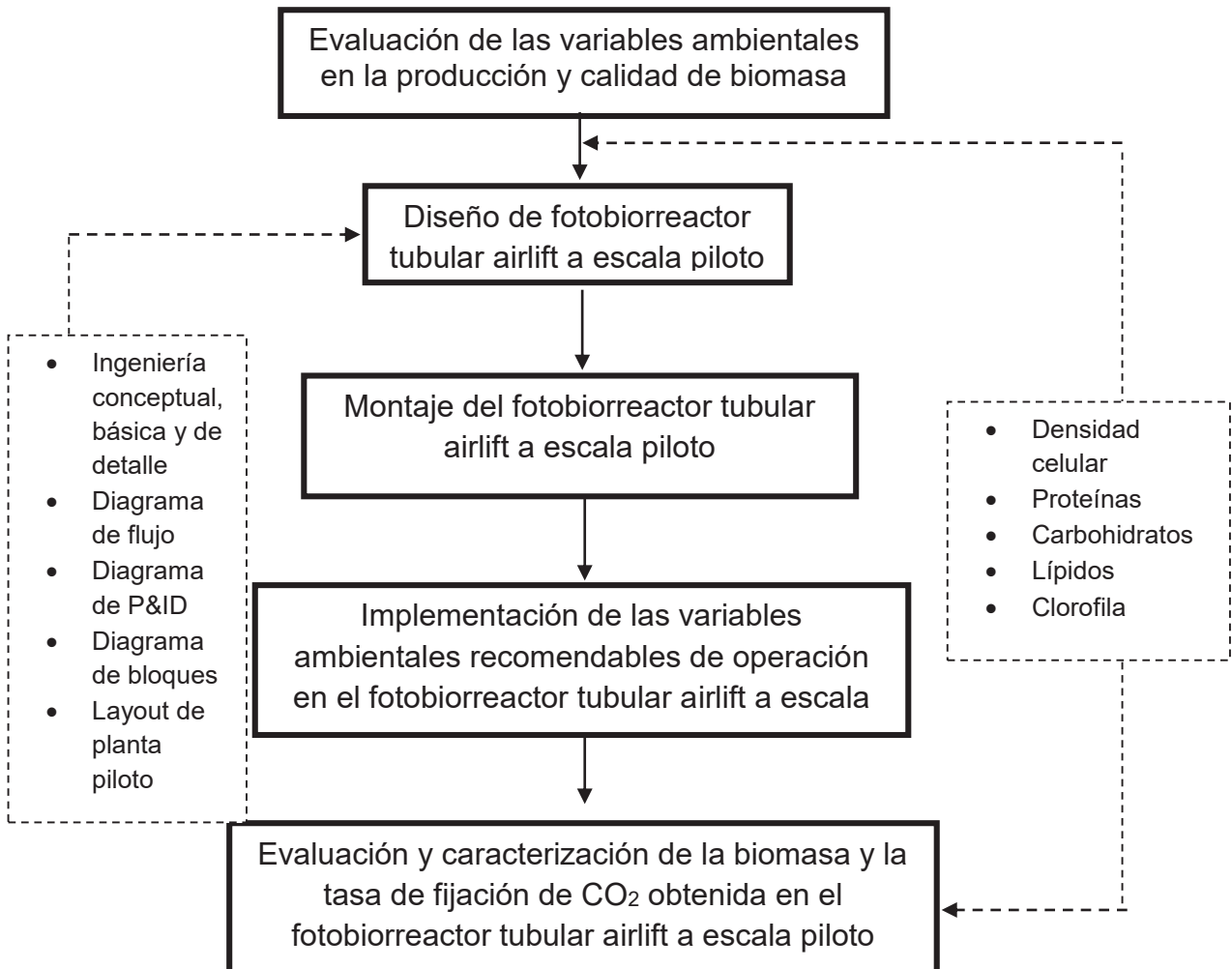


Figura 2.1. Metodología

**2.1. Etapa I. Evaluación de las variables ambientales: Luminosidad, nutrientes, CO<sub>2</sub>**

**2.1.1. Obtención y adaptación de la microalga *Chlorella spp.***

De acuerdo con la investigación realizada por (González-Falfán, 2015) con respecto a los medio de cultivo se utilizaron dos para *Chlorella spp.* los cuales fueron: MBB (Medium Bold Basal) y f/2 de Guillard y Ryther (1973). Los mejores resultados que obtuvo en crecimiento celular fueron utilizando MBB, por lo que se usó la formulación del medio de cultivo utilizado en su experimentación. Los mejores resultados que obtuvo son mostrados en la Tabla 2.1.

Durante esta etapa se adaptó la microalga (Figura 2.2) a temperatura ambiente y se le aplicó una agitación por burbujeo de aire y una iluminación en fotoperiodos de 12 horas luz-obscuridad mediante dos lámparas fluorescentes de luz fría de 20 watts.



Figura 2.2. Adaptación de la microalga *Chlorella spp*

Tabla 2. 1 Variables ambientales obtenidas por (González-Falfán, 2015) para el crecimiento de *Chlorella spp.*

Luminosidad	Nutrientes	CO <sub>2</sub>
2000 lux	1 mL/L	2% v/v



La microalga *Chlorella spp* es de agua dulce esta fue obtenida del Centro de Estudios Técnicos del Mar (C. E. T. Mar 07) en Veracruz, Veracruz.

### 2.1.2. Adecuación del diseño experimental

Para la determinación del efecto de las variables ambientales, se evaluó diferentes concentraciones de luminosidad, nutrientes y CO<sub>2</sub>. La Tabla 2.2 muestra los valores a los que se trabajaron y que fueron implementados en análisis experimentales.

Tabla 2. 2 Variables ambientales consideradas para su evaluación

<b>Variable ambiental</b>	<b>Nivel bajo</b>	<b>Nivel medio</b>	<b>Nivel alto</b>
Luminosidad (lux)	2000	3000	4000
Nutrientes (mL/L)	0.5	1	1.5
CO <sub>2</sub> (% v/v)	2	7	12

#### 2.1.2.1. Determinación de la dosis recomendable de nutrientes

Para determinar la dosis recomendable de nutrientes, se utilizó el medio de cultivo MBB formado por 10 soluciones stock (Figura 2.3) que se enlistan en el Anexo B para su preparación. Seguido a esto se llevaron a cabo cinéticas en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con un volumen útil de 400 mL, los cuales se mantuvieron durante 40 días en condiciones de cultivo.



Figura 2.3 Soluciones stocks

La manera que se evaluó fue por medio de un diseño unifactorial, donde solo se consideraron las dosis de 0.5, 1.0 y 1.5 mL/L de nutrientes con muestra y dos replicas, teniendo como variable de respuesta la densidad celular. En la Tabla 2.3 se muestra los factores y los niveles evaluados en el diseño de experimentos.

Tabla 2. 3 Niveles del diseño unifactorial

Experimento	Dosis
1	0.5
2	0.5
3	0.5
4	1.0
5	1.0
6	1.0
7	1.5
8	1.5
9	1.5

Al finalizar las cinéticas se realizó un análisis de varianza mediante el software NCSS 2007 y así determinar la mejor dosis de nutrientes.

### 2.1.2.2. Determinación de dosis recomendable de luminosidad y CO<sub>2</sub>

Obtenida la dosis recomendable de nutrientes se procedió a hacer un diseño de experimentos 3<sup>2</sup>, en el cual se tienen dos factores a evaluar y tres niveles, teniendo como variable de respuesta la densidad celular. En la Tabla 2.4 se muestran las variables codificadas y naturales correspondientes a la luminosidad y CO<sub>2</sub> evaluados.

Estos se llevaron a cabo en matraces de 2000 mL con un volumen efectivo de 1200 mL, estos se mantuvieron durante 15 días en condiciones de cultivo como se muestra en la Figura 2.4. Diariamente se tomaron muestras para evaluar pH, absorbancia y conteo celular por cámara de Neubauer, todos los análisis se

realizaron por duplicado. Posteriormente el análisis de varianza se realizó en el software NCSS 2007.



Figura 2.4. Evaluación de CO<sub>2</sub> y luminosidad con la dosis recomendable

Tabla 2. 4 Factores y niveles del diseño 3<sup>2</sup>

Experimento	Variables codificadas		Variables naturales	
	CO <sub>2</sub> % v/v	Luminosidad (Lux)	CO <sub>2</sub> % v/v	Luminosidad (Lux)
1	-1	-1	2	2000
2	0	-1	7	2000
3	1	-1	12	2000
4	-1	0	2	3000
5	0	0	7	3000
6	1	0	12	3000
7	-1	1	2	4000
8	0	1	7	4000
9	1	1	12	4000

### 2.1.3. Caracterización de la biomasa producida

#### 2.1.3.1. Determinación de la densidad celular

Para la realización de las curvas de calibración se realizó un conteo celular con un hematocitómetro o cámara de Neubauer. El cálculo se expresó en células/mL. A

los datos obtenidos se les realizará un análisis de regresión lineal para obtener la ecuación de la recta de la especie *Chlorella spp.* en cada volumen de cultivo. Estas ecuaciones son las que se utilizarán para conocer la concentración en cel/mL del cultivo

Para el cálculo de la densidad celular se utilizó la siguiente formula realizando los conteos en los cinco cuadros del block central de la cámara de Neubauer:

$$D = \frac{\text{Numero de celulas contadas} * 250000}{5} \quad (2.1)$$

Dónde:

D = densidad celular (cel/mL)

5 = número de cuadros

### 2.1.3.2. Tasa de crecimiento celular

De acuerdo a Band (1997) y Morris (2004), con los valores obtenidos de densidad celular en los cultivos, se va a determinar la velocidad o tasa de crecimiento celular, tiempo de duplicación y número de generaciones:

La tasa de crecimiento celular ( $\mu$ )

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{\Delta t} \quad (2.2)$$

Donde:

$\mu$ = velocidad o tasa de crecimiento.

$X_1$ = densidad celular al tiempo t.

$X_0$ = densidad celular al tiempo inicial.

El tiempo de duplicación ( $t_d$ ):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2.3)$$

Donde:

$t_d$  = tiempo de duplicación.

$\mu$  = velocidad o tasa de crecimiento.

### 2.1.3.3. Determinación de la densidad celular-absorbancia

Para obtener las lecturas de absorbancia por medio de un espectrofotómetro, primeramente se realizó una curva de calibración en fase exponencial, donde esta a su vez se encuentre a distintas concentración (1:10-10:10) mL. De esta manera serán relacionados los datos de densidad celular realizando un conteo con la cámara de Neubauer y haciendo tomas de absorbancia a 750 nm para *Chlorella spp.* (Caballero, 2012). Los datos fueron graficados relacionando la absorbancia con el número de células contadas.

### 2.1.3.4. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se hizo por medio del método descrito por Lowry *et al.*, 1951. La absorbancia de la muestra se determinó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. Las concentraciones fueron calculadas por medio de una curva de calibración.

### 2.1.3.5. Determinación del contenido de carbohidratos

La determinación del contenido de carbohidratos, se realizó por el método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 492 nm. Las concentraciones se calcularon mediante una curva de calibración con glucosa (Anexo A).

### 2.1.3.6. Determinación de lípidos

La cuantificación del contenido de lípidos se realizó con el método de Soxhlet (Official Methods of Analysis A.O.A.C. 15th Edition, U.S.A.1990) utilizando el solvente orgánico para facilitar la extracción.

### 2.1.3.7. Clorofilas

La determinación de clorofilas a y b que son características de la microalga *Chlorella spp* se determinó por medio del método de (Jeffrey y Humprey, 1957) extrayendo los pigmentos mediante un solvente orgánico. Las absorbancias se leyeron a longitudes de onda de 445 nm y 660 nm (Anexo A).

### 2.1.3.8. Productividad de la biomasa

Para el cálculo de la productividad máxima se determinó por medio de la ecuación reportada por (Jacobo- Lopes *et al.*, 2009).

$$P_{max} = \left( \frac{X_1 - X_0}{t - t_0} \right) \quad (2.4)$$

Donde:

$X_1$  concentración de la biomasa (g/L) al tiempo que esta el cultivo  $t_1$

$X_0$  concentración de la biomasa (g/L) al tiempo inicial  $t_0$

### 2.1.3.9. Determinación de la tasa de fijación CO<sub>2</sub>

El cálculo de la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ ) se evaluó relacionando el contenido del carbono en las células y la productividad máxima de la biomasa de las microalgas. Esta se determinó de la siguiente ecuación (2.5) (Jacobo- Lopes *et al.*, 2009):

$$P_{CO_2} = C_C P_{max} \left( \frac{M_{CO_2}}{M_C} \right) \quad (2.5)$$

Donde:

$P_{max}$  productividad de la biomasa (g/L d)

$M_{CO_2}$  es el peso molecular del CO<sub>2</sub> (g/mol)

$M_c$  es el peso molecular del carbono (g/mol)

$C_c$  es la cantidad de carbono en las células de la microalga

## 2.2. Etapa II. Diseño de un fotobiorreactor tubular Airlift a escala piloto

Para el diseño del fotobiorreactor airlift se emplearon ecuaciones de (Fernández *et al.*, 2014) que permitieron el dimensionamiento del equipo donde se especifica el diámetro del *downcomer* ( $D_d$ ) y el *riser* ( $D_r$ ), el volumen y la altura total, así como el volumen y la altura de operación.

Para el cálculo del diámetro de *downcomer* se despejó  $D_d$  de la ecuación 2.6 tomando como límite superior del rango 0.6 con el fin de obtener el valor máximo de dicho diámetro.

$$D_r = [0.3 \text{ a } 0.6]D_d \quad (2.6)$$

Para la altura total del equipo (H) en la ecuación 2.7 de igual forma se tomó el valor superior de este rango.

$$H = [3 \text{ a } 6]D_d \quad (2.7)$$

Para el volumen total del *downcomer* ( $V_{Td}$ ) dado en la ecuación 2.8 esta expresada en función de diámetro donde se tiene en cuenta el volumen de un cilindro se expresa en función del área ( $A_{base} = \frac{\pi}{4}D_d^2$ ) y la altura (H), obteniendo la siguiente:

$$V_{Td} = \frac{\pi H D_d^2}{4} \quad (2.8)$$

Para el cálculo del volumen total del equipo se determina la suma del volumen total del *downcomer* ( $V_{Td}$ ) y las tapas del equipo ( $V_t$ ). El volumen de las tapas se calcula teniendo en cuenta su geometría y posición. El volumen del equipo viene

dado por la ecuación 2.9. Para este caso  $V_t$  es cero ya que no cambia su volumen interno.

$$V_T = V_{Td} - V_t \quad (2.9)$$

En el cálculo del volumen de operación ( $V_{op}$ ) se calcula mediante la ecuación 2.10 tomando un valor intermedio de los valores (0.8).

$$V_{op} \approx [0.7 \text{ a } 0.9]V_T \quad (2.10)$$

Posterior al cálculo de cada uno de los valores para el dimensionamiento del fotobiorreactor se procedió a hacer un diseño primario en 3D en el software Autocad 2010 de la planta piloto con la finalidad de visualizar y detallar cada parte del diseño inicial. Posteriormente se realizaron los diseños en Edraw Max 7.9.

### 2.2.1. Ingeniería conceptual

Esta etapa del diseño del fotobiorreactor se identificó la viabilidad técnica, es decir un estudio previo para el desarrollo de la ingeniería básica y de detalle. Este inicia con las especificaciones del fotobiorreactor, descripción del proceso de fabricación y lista preliminar de equipos. Lo principal que se analizó es lo siguiente:

- Productos y capacidad de la producción
- Normativa y regulación
- Descripción general de instalación
- Diagramas de bloques, distribución de salas y diagrama del proceso

El software utilizado para el desarrollo de los diagramas fue Edraw Max 7.9.

### 2.2.2. Ingeniería básica y de detalle

En esta etapa se realizó el cálculo del caudal y la potencia de la bomba. Así mismo se realizó una revisión detallada de los diagramas DTI (Diagrama de tuberías e instrumentación) también conocido por sus siglas en inglés P&ID (Píping and Instrumentation diagram), planos de detalle de instalación y diagramas isométricos.



En este mismo se hizo el cálculo de caudal y potencia de la bomba que se seleccionó para la recirculación de medio de cultivo en los fotobiorreactores.

Así mismo se realizó una lista de los equipos, materiales y accesorios que fueron ocupados dentro de la instalación del fotobiorreactor. También se dan las especificaciones funcionales de los equipos que conforman el fotobiorreactor y a su vez se dan las especificaciones técnicas de los equipos.

El diagrama P&ID fue realizado en el Software Edraw Max 7.9.

### **2.3. Etapa III. Montaje del fotobiorreactor tubular Airlift a escala piloto**

En esta etapa se realizó la puesta en marcha de cada una de las partes diseñadas. Tres partes que se revisaron son:

- El material y construcción del fotobiorreactor.

Lo primero que se hizo, fue revisar la existencia de las medidas requeridas de los tubos de acrílico dentro del catálogo del proveedor, el grosor del tubo de acrílico y la altura calculada. Posteriormente fue confeccionado, barrenado y montado el tubo de acrílico que servirá como el cuerpo del fotobiorreactor. Dentro del diseño se contempla una base para colocar el fotobiorreactor (Anexo C).

- Luminosidad

Dentro de lo que también se revisó fue el número de lámparas, la cuantificación de los luxes que emiten por medio de un luxómetro Steren (HER-410) en la superficie del fotobiorreactor, la posición adecuada para un buen suministro de luz y las lámparas fluorescentes de luz fría dentro de las cuales fueron del tipo que se solicitaron.

- Bombas y recirculación

Se realizó el análisis del tipo de bombas que se pueden utilizar para la recirculación. Así mismo la verificación del diámetro de las tuberías que van conectadas al fotobiorreactor para hacer recircular el medio de cultivo como nueva

adaptación de los fotobiorreactores Airlift. Después de esto se solicitan al proveedor y una vez adquiridas se realizaron pruebas hidráulicas para ver si no hay fugas y observar el funcionamiento de las bombas.

- Soportes y abrazaderas para fotobiorreactores

El diseño de soportes y abrazaderas de acuerdo al tamaño de los fotobiorreactores se construyeron y se supervisaron las medidas que fueran las adecuadas.

- Flujos de aire y CO<sub>2</sub>

Se verificó los flujos de suministro de aire, así mismo en el *riser* que haya tenido un buen funcionamiento, que la burbuja a su salida tenga un flujo homogéneo y que los flujos de ascendentes y descendentes puedan proporcionar homogeneidad al sistema.

En el suministro de CO<sub>2</sub> se revisó el flujo en mL/min adecuándolo a las condiciones establecidas, así mismo las válvulas check y conexiones que este mismo necesita.

#### **2.4. Etapa IV. Implementación de las variables ambientales recomendables en el fotobiorreactor a escala piloto**

Lo que se llevó a cabo dentro de esta etapa fue la implementación de los mejores resultados obtenidos de iluminación, CO<sub>2</sub> y nutrientes. Los valores tomados fueron comparados con respecto al crecimiento celular que obtuvo y a la calidad de la biomasa obtenida.

Tabla 2. 5 Condiciones recomendables obtenidas

Nutrientes	Luminosidad	CO <sub>2</sub>
<b>1.5 mL</b>	4000 lux	2% v/v

El medio de cultivo junto con la microalga *Chlorella spp* se puso en crecimiento con un mínimo de 45 días de operación donde fue monitoreada y evaluada la biomasa.

## **2.5. Etapa V. Evaluación y caracterización de la biomasa producida a escala piloto**

### **2.5.1.1. Determinación de la densidad celular**

En esta etapa se realizó un conteo celular con un hematocitómetro o cámara de Neubauer. El cálculo se expresó en células/mL, utilizando la ecuación 2.1 para la obtención de resultados durante 45 días.

### **2.5.1.2. Determinación de proteínas**

La determinación de proteínas se hizo a partir de la determinación de nitrógeno total por medio del método Kjendahl, tomada a partir de los métodos estándares para el análisis de aguas y aguas residuales (NOM 4500- norg- B- SM).

### **2.5.1.3. Determinación del contenido de carbohidratos**

La determinación del contenido de carbohidratos, se realizó por el método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) y se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 492 nm. Las concentraciones se calcularon mediante una curva estándar hecha con glucosa (Anexo A).

### **2.5.1.4. Determinación de lípidos**

La cuantificación del contenido de lípidos se realizó con el método de Soxhlet (Official Methods of Analysis A.O.A.C. 15th Edition, U.S.A.1990) utilizando el solvente orgánico para facilitar la extracción.

### **2.5.1.5. Determinación de clorofilas**

La determinación de clorofilas a y b que son características de la microalga *Chlorella spp* se determinó por medio del método de (Jeffrey y Humprey, 1957) extrayendo los pigmentos mediante un solvente orgánico. Las absorbancias se leyeron a longitudes de onda de 445 nm y 660 nm (Anexo A).

#### **2.5.1.6. Determinación de la tasa de fijación CO<sub>2</sub>**

El cálculo de la productividad de la biomasa fue calculado por la ecuación (2.4) y la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> expresada por la ecuación (2.5) de acuerdo a (Jacobolopes *et al.*, 2009) se determinó el % de CO<sub>2</sub> consumido utilizando los resultados del cromatógrafo de gases.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se describe los resultados experimentales que fueron obtenidos para dar cumplimiento a los objetivos planteados. Se trabajó con el alga *Chlorella spp.* primeramente a nivel laboratorio y posteriormente se realizó el dimensionamiento en planta piloto.

#### ■ Curva de calibración de *Chlorella spp.*

Durante la etapa de adaptación de la microalga *Chlorella spp.* se tomaron datos de absorbancia con respecto al crecimiento celular lo que sirvió como base para realizar una curva de calibración y observar la adaptación del alga en el MBB. Se obtuvo un valor  $R^2 = 0.9743$  (Figura 3.1), con lo cual la curva de calibración puede ser considerada para conocer la densidad del cultivo utilizando la absorbancia como variable independiente (Domínguez, 2014).

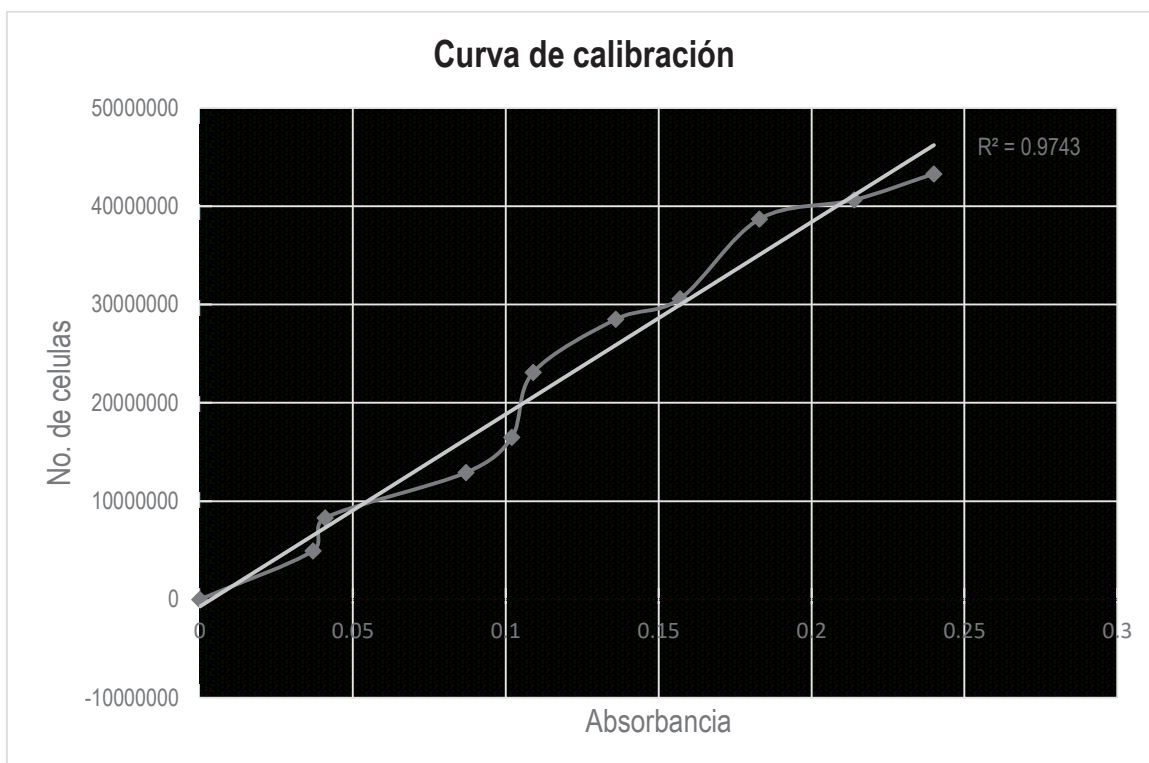


Figura 3. 1 curva de calibración de alga *Chlorella spp*

■ Diseño unifactorial

**3.2.1 Densidad celular**

En la Figura 3.2 el promedio del crecimiento celular de *Chorella spp.* en las cinéticas de crecimiento aplicando diferentes dosis de nutrientes en un periodo de 40 días, se obtuvo un mayor crecimiento en la dosis 1.5 mL de  $7.26 \times 10^7$  cel/mL. El menor crecimiento se obtuvo en la dosis 0.5 mL siendo de  $4.60 \times 10^7$  cel/mL. El valor máximo alcanzado por cada una de las dosis de nutrientes aplicadas, y donde se mostraron los mejores resultados fue en la dosis 1.5 mL, mientras que las dosis 1 mL mostró un buen crecimiento hasta el día 19 en donde la falta de nutrientes detuvo su crecimiento manteniéndola en una concentración más baja. Así la dosis de 0.5 mL llegando a un buen crecimiento hasta el día 15.

Se realizó el monitoreo de la dosis 0 mL, el cual muestra el crecimiento de la alga *Chlorella spp.* Sin MBB, obteniendo un crecimiento hasta el día 8 donde la falta de nutrientes propició la inhibición del desarrollo de la microalga.

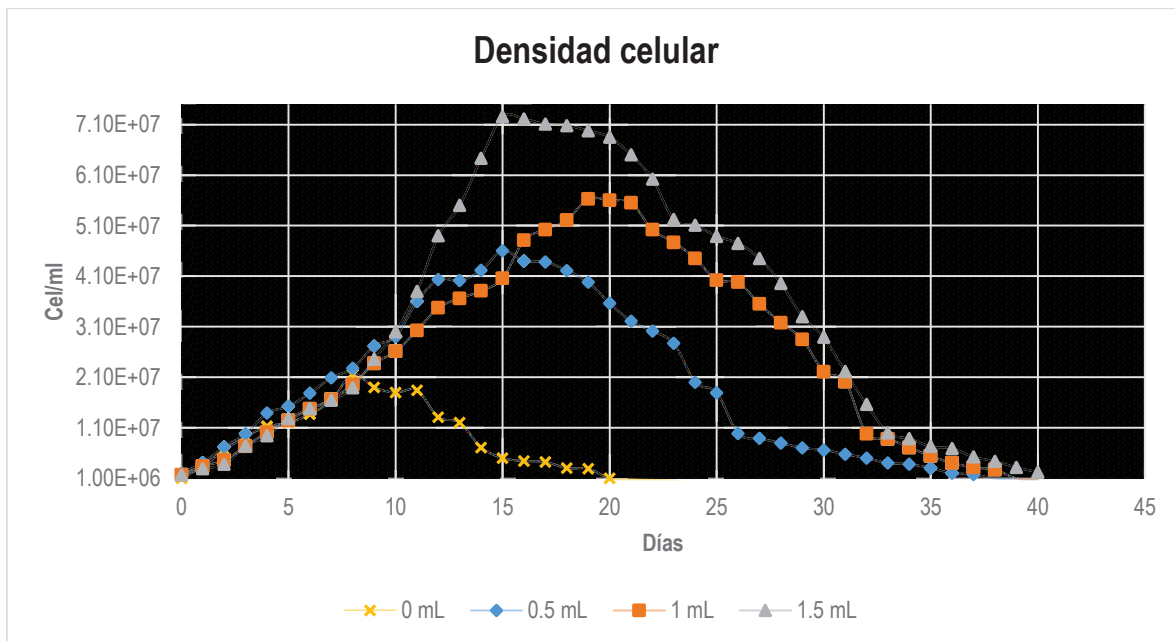


Figura 3. 2 Densidad celular promedio a diferentes dosis de medio de cultivo

### 3.2.2 Determinación de dosis recomendable de nutrientes

Se llevó a cabo un análisis de varianza y una prueba de Duncan, para comparar las medias obtenidas durante los experimentos utilizando el software NCSS 2007 y se empleó como variable de respuesta el crecimiento de la microalga.

En la Tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de varianza, el cual demostró que la dosis de medio de cultivo influye significativamente sobre el crecimiento de la microalga *Chlorella spp.* Realizando la comparación de la F estadística de Fisher, la F tablas fue de 4.07 y la F de prueba calculada fue 95.35 lo que podemos comprobar lo dicho anteriormente. La dosis correspondiente a 1.5 mL/L obtuvo la mayor media estadística y se optó por utilizar esta relación como la dosis recomendable. Se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de 1.99 divisiones/día. Se ha reportado para la microalga *Chlorella pyrenoidosa* una velocidad de 1.74 días<sup>-1</sup> (Liao, 2014).

Tabla 3. 1 ANOVA para las cinéticas de aplicación de micronutrientes, macronutrientes y vitaminas

Término	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Prueba F	Prob. nivel	Alpha=0.05
A:Nutrientes	3	44.46575	14.82192	95.35	0.000001*	1.00000
S(A)	8	1.243589	0.1554486			
Total (Ajustado)	11	45.70934				
Total	12					

\*Término significativo de alpha=0.05

Por otra parte, en la Tabla 3.2 se observan los resultados obtenidos en la prueba de media de cuadrados de Duncan, en la cual se aprecia que, el control (dosis 0 mL) resulta ser significativamente diferente a las demás dosis, con una media de



0.5503 debido al poco crecimiento de la microalga, y muy por debajo de las medias obtenidas en el resto de las cinéticas. La dosis 1 mL/L y 0.5 mL/L no presentan diferencia significativa entre ellas, sin embargo, la dosis 1.5 mL/L obtuvo la mayor media estadística con respecto al crecimiento de la microalga, por lo cual se optó por utilizar ésta relación de micronutrientes, macronutrientes y vitaminas.

Tabla 3. 2 Prueba de Duncan para cinéticas de aplicación de micronutrientes, macronutrientes y vitaminas

Grupo	Orden	Media	Diferencia entre grupos
0	3	0.5503333	1, 0.5, 1.5
1	3	4.180666	0, 1.5
0.5	3	4.453333	0, 1.5
1.5	3	5.726333	0, 1, 0.5

### 3.2.3 Caracterización de la biomasa producida

#### 3.2.3.1. pH

Los valores obtenidos de pH de la microalga durante los primeros 40 días se mantuvieron dentro de los valores aceptables. El pH nos indica que puede ser una forma cuantitativa de la cantidad de biomasa, esto es a mayor biomasa mayor degradación de bicarbonatos, por lo que existe una elevación de la producción de grupos hidroxilos, aumentándose así el pH (Rodríguez y Triana, 2006). Apareciendo la Figura 3.3, se observa que las dosis evaluadas durante las cinéticas de crecimiento tienen una elevación de pH como consecuencia mayor producción de biomasa.

Khalil ZI *et al.* (2010) citados en Gong *et al.* (2014) demostraron que *Chlorella* es capaz de crecer en un amplio rango de pH (4-10) teniendo el mayor rendimiento de biomasa bajo condiciones alcalinas (de 9 a 10).

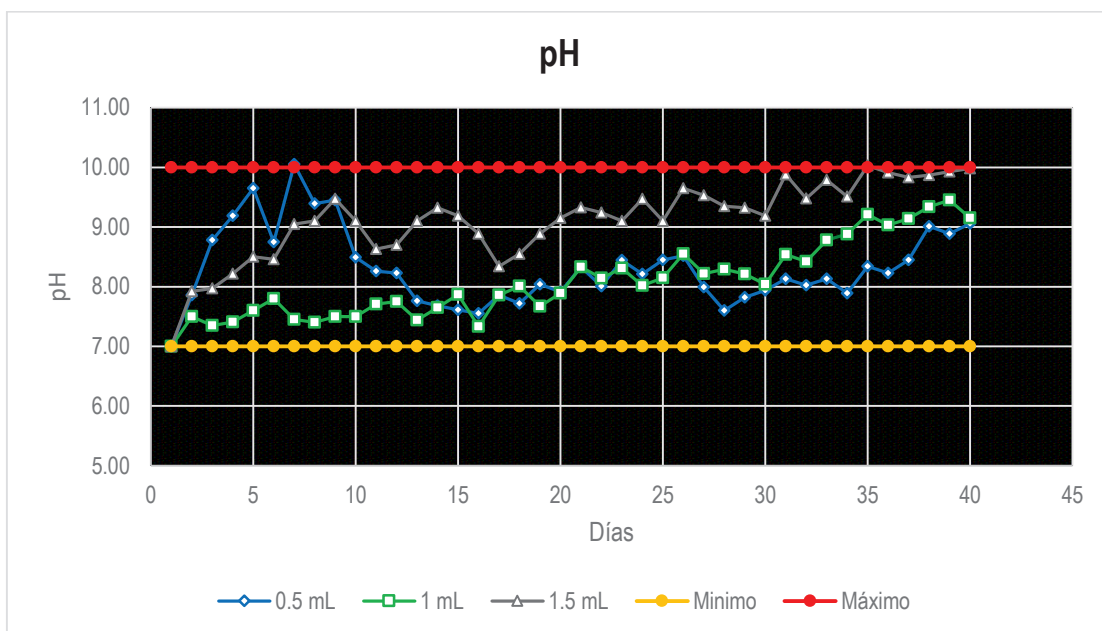


Figura 3. 3 Comportamiento promedio de pH

(Morris *et al.*, 2004) reportó valores de pH entre 6.15-8.24 dentro de su desarrollo. (Li-Hai Fan *et al.*, 2008) obtuvo valores de pH de 7.02 a 8.25 alcanzados en un fotobiorreactor operado con la microalga *Chlorella vulgaris*. Los valores obtenidos en el presente estudio demuestran que el pH a una dosis de 0.5 mL va incrementándose hasta el día 10, posterior a esto va disminuyendo lo que puede deberse a la falta de nutrientes y a la poca producción de biomasa. En la concentración 1 mL se observa con valores similares durante su crecimiento y en la dosis de 1.5 mL se observa que los valores de pH van incrementando hasta llegar a un máximo de 9 por lo que se mantiene debido a la gran cantidad de biomasa generada.

### 3.2.3.2. Densidad celular por espectrofotometría

En la Figura 3.4 se muestran los datos promedio de las diferentes dosis, entre cada una de estas muestran el crecimiento progresivo de la microalga y observándose poca diferencia entre cada dosis. (Infante y Angulo, 2012) reportaron que en los primeros días de crecimiento celular la absorbancia obtenida estaba entre el rango de 0.010 a 0.568. Comparando los resultados vemos que los

datos obtenidos muestran una absorbancia similar, en la dosis 0.5 mL se observaron valores mayores considerando que se debió a tuvo buena productividad desde el inicio del cultivo pero conforme fue creciendo no supero a la dosis 1.5 mL.

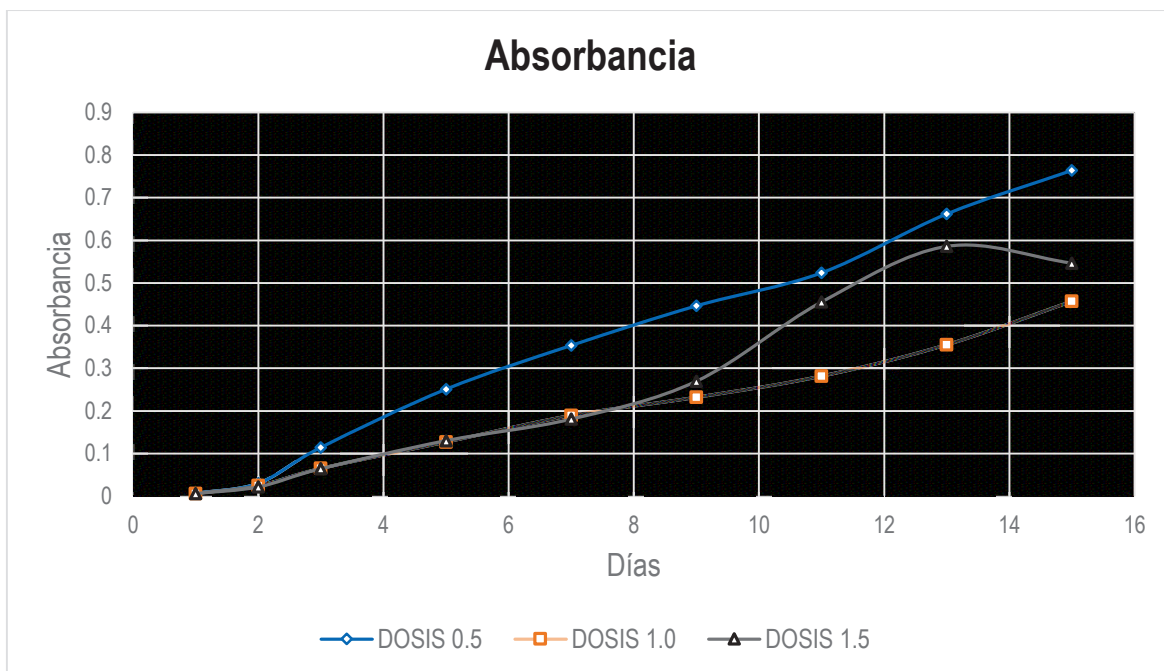


Figura 3. 4 Comportamiento promedio de absorbancia

### 3.2.3.3. Tasa de crecimiento celular

En la Tabla 3.3 se muestran los datos obtenidos de la velocidad específica de crecimiento (divisiones/ día) y el tiempo de duplicación (días). (Liao *et al.*, 2014) reportó para la microalga *Chlorella pyrenoidosa* una velocidad de  $1.74 \text{ días}^{-1}$ . De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo la dosis 1.5 mL presenta una mayor velocidad de crecimiento específica, es decir, crece progresivamente y se divide en  $1.99 \approx 2$  células por día y el tiempo requerido para que cada célula se divida es de 0.34 días. En cambio la dosis 1 mL tiene una menor velocidad de crecimiento pues presenta una división de células de 1.52 células por día en 0.45 días.

Tabla 3. 3 Tasa de crecimiento celular.

	Fórmula	0.5 mL	1 mL	1.5 mL
Velocidad específica de crecimiento (divisiones/día)	$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_0}{t_2 - t_1}$	1.95	1.52	1.99
Tiempo de duplicación (días)	$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$	0.36	0.45	0.34

### 3.2.3.4. Determinación de carbohidratos

En la Figura 3.5 se muestra la curva de calibración para la determinación de carbohidratos por el método de Dubois obteniendo un  $R^2=0.9602$  para la evaluación con el alga *Chlorella spp.* En la Figura 3.6 se muestra una comparativa de los carbohidratos obtenidos en las diferentes dosis, observándose que en la dosis 0.5 y 1.5 mL existe mayor producción de carbohidratos.

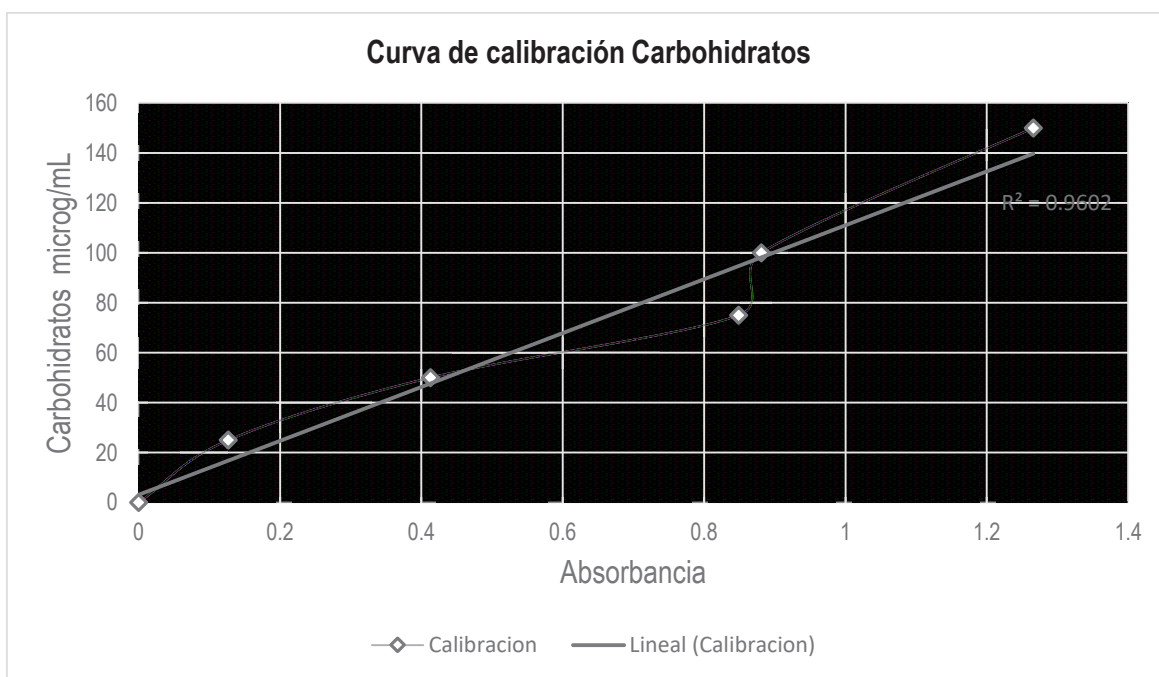


Figura 3. 5 Curva de calibración de glucosa

A pesar de que el contenido de carbohidratos por célula para la concentración de 1.5 mL fue bajo, el cultivo tuvo la mayor afinidad y productividad volumétrica.

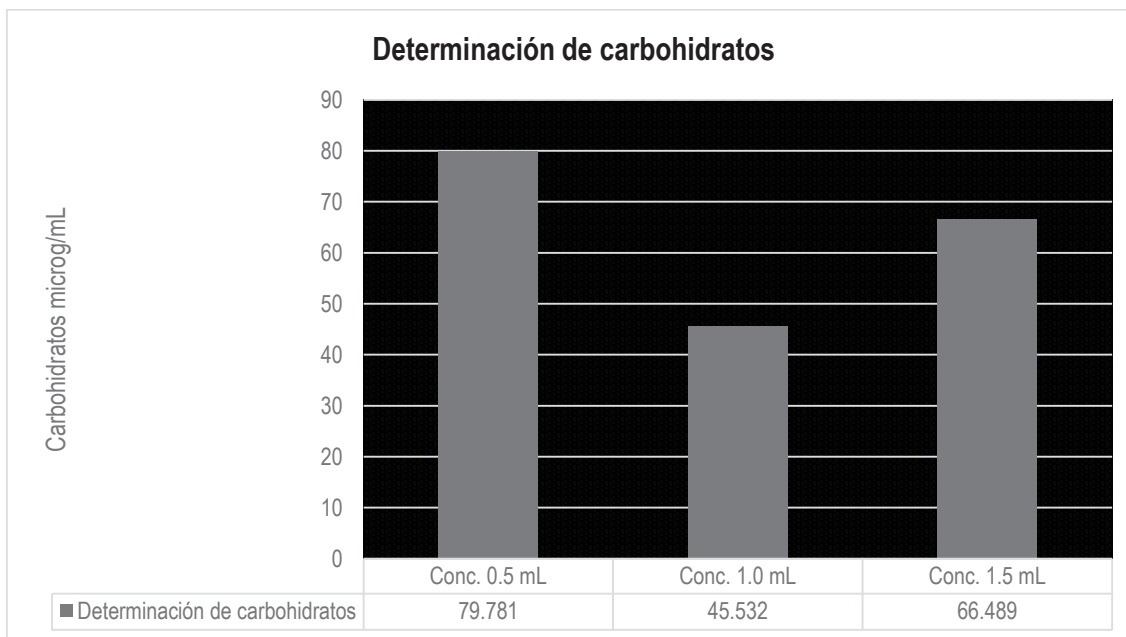


Figura 3. 6 Determinación de carbohidratos a diferentes concentraciones

### 3.2.3.5. Determinación de lípidos

(Cobos y Castro, 2010) realizaron un estudio con cinco diferentes microalgas para obtener el contenido de lípidos totales de cada especie. Las especies que acumularon mayor cantidad de lípidos totales (mg/g biomasa seca) fueron aquellas cultivadas en medios sin nitrógeno: *A. nannoselene* (316 mg/g biomasa seca), *Ankistrodesmus spp.* (263.6 mg/g biomasa seca), y *Scenedesmus spp.* (243.3 mg/g biomasa seca), con respecto a *S. quadricauda* y *Chlorella spp.* que mostraron menor contenido lipídico, con 159.1 mg/g biomasa seca y 221.1 mg/g biomasa seca respectivamente, y con lo cual se menciona que la *Chlorella spp.* no posee un alto contenido de lípidos totales.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la dosis 1.5 mL obtuvo un máximo de lípidos presentes en la microalga *Chlorella spp.* con un valor de promedio de 16.10g/100 g biomasa, comparado con la dosis 0.5 mL donde se obtuvieron 13.20

g/100g biomasa y para la dosis de 1mL 14.28g/100g biomasa como se observa en la Figura 3.7.

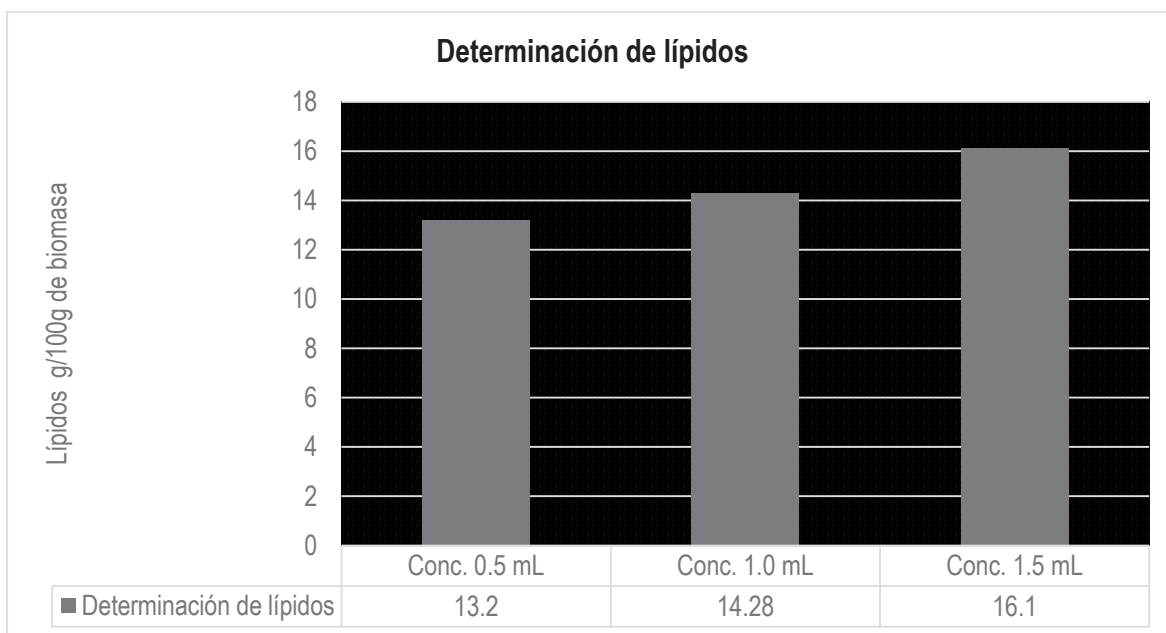


Figura 3. 7 Determinación de lípidos a diferentes concentraciones

### 3.2.3.6. Determinación de proteínas

El resultado obtenido en la presente investigación fue de 260.61 mg/L para la dosis 1 mL siendo el valor más alto obtenido, seguido de la dosis 1.5 mL con un resultado promedio de 258.341 mg/L. en la Figura 3.8 se muestran los resultados obtenidos.

Chacón *et al.* (2004) reportaron un valor proteico de  $461.5 \pm 48 \mu\text{g/mL}$  para *Chlorella spp.* cultivada en fase estacionaria en agua residual filtrada. Sin embargo, el resultado obtenido en el mejor tratamiento en este diseño experimental fue bajo ( $7.51 \mu\text{g/mL}$ ).

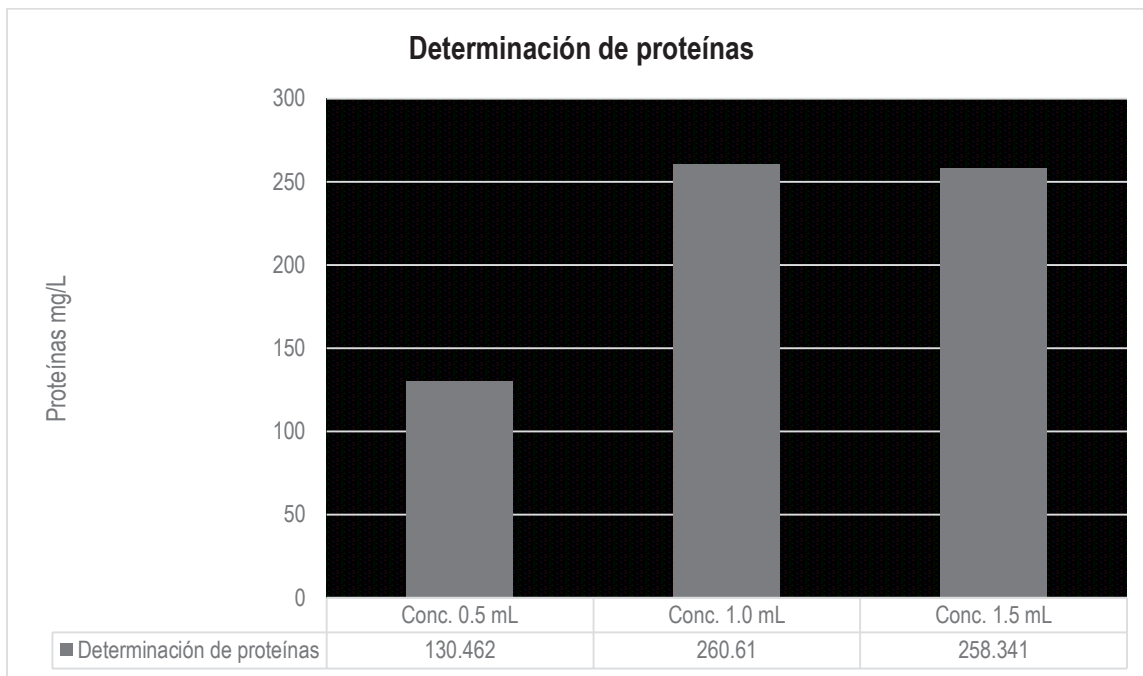


Figura 3. 8 Determinación de proteínas a diferentes concentraciones

### 3.2.3.7. Determinación de clorofilas

En la Figura 3.9 se muestran los resultados obtenidos de clorofila *a* y *b*, obteniendo un valor máximo de clorofila *a* de 30.6185 mg/L, y de clorofila *b* de 18.623 mg/L, este valor corresponde a una concentración de 1.5 mL, seguido de 14.2385 mg/L de clorofila *a* y 8.5439 mg/L de clorofila *b* para una concentración de 1.0 mL. Y finalmente se obtuvo un valor de 10.9075 mg/L de clorofila *a* y 5.8705 mg/L de clorofila *b* para una concentración de 0.5 mL.

González-Falfán, (2015) realizó un estudio sobre los pigmentos fotosintéticos promedio de la microalga *Chlorella spp.* Obteniendo un rango de clorofila *a* de 30 a 43 mg/L y de clorofila *b* de 13 a 25.5 mg/L.

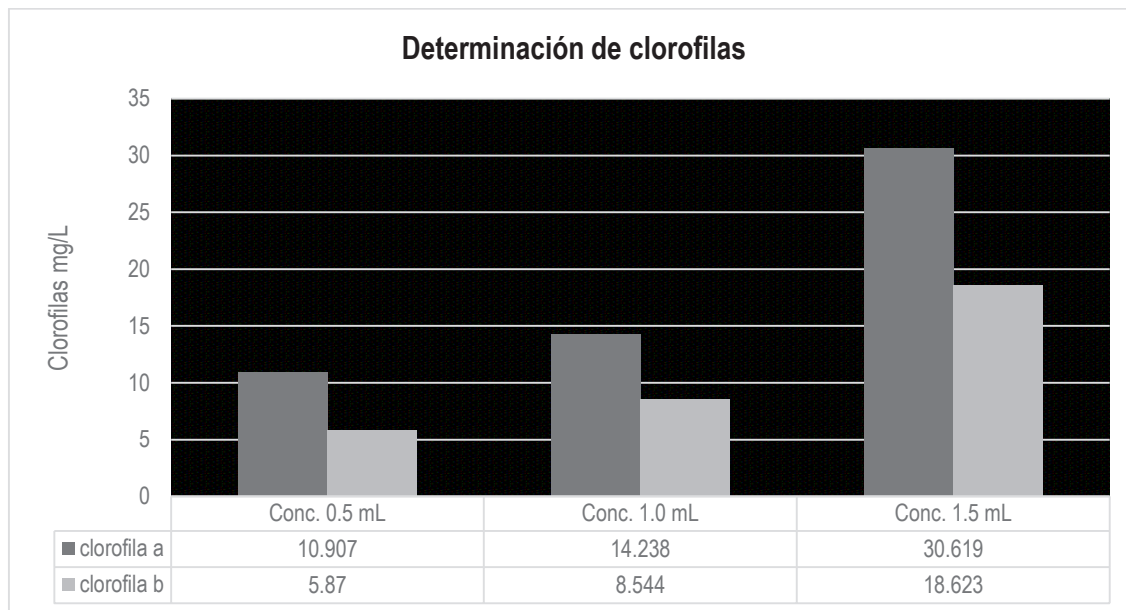


Figura 3. 9 Determinación de clorofila *a* y *b* a diferentes concentraciones

### ■ Diseño 3<sup>2</sup>

#### 3.3.1 Determinación de dosis recomendable de luminosidad y CO<sub>2</sub>

Realizando una comparación de los valores obtenidos, se decidió realizar cultivos con la dosis 1.5 mL debido a su buena producción de biomasa y carbohidratos, estas se realizaron en 9 Matraces Erlenmeyer, nombrados fotobiorreactores (FBR) de 2 L, con un volumen útil de 1.5 L, bajo iluminación de fotoperiodos 12:12 h en diferentes Lux (2000, 3000 y 4000), y suministro de CO<sub>2</sub> a diferentes concentraciones (2%, 7% y 12% v/v) con periodos de 2 días con y 2 días sin suministro.

Se llevó a cabo un análisis de varianza y una prueba de Duncan, para comparar las medias obtenidas durante los experimentos utilizando el software NCSS 2007 y se empleó como variable de respuesta el crecimiento de la microalga.

Los resultados obtenidos en la Tabla 3.4 nos muestran el análisis de varianza, el cual demostró que la luminosidad tiene una diferencia significativa sobre el crecimiento de la microalga *Chlorella spp.* Realizando la comparación de las F estadísticas de Fisher, la F tablas de CO<sub>2</sub> fue de 6.94 observándose una mínima



diferencia entre el valor de la F calculada que fue de 5.25. Contrastando los valores anteriores, la F tablas de la luminosidad es de 6.94 y la F calculada es de 12.77 resaltando una diferencia mucho mayor sobre la luminosidad. Lo que podemos decir es que con la luminosidad existe un nivel de probabilidad mayor de que crezca o afecte más su crecimiento.

Tabla 3. 4 ANOVA para cinéticas en la evaluación de CO<sub>2</sub> y luminosidad

Termino	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Prueba F	Prob nivel	Alfa=0.05
A: CO <sub>2</sub>	2	1.422867	0.7114334	5.25	0.076064	0.487672
B: Luminosidad	2	3.458867	1.729433	12.77	0.018344*	0.846232
S	4	0.5418667	0.1354667			
Total (ajustado)	8	5.4236				
Total	9					

Valor ajustado al =0.05

Tabla 3. 5 Prueba de Duncan para cinéticas de aplicación de luminosidad y CO<sub>2</sub>

Grupo	Orden	Media	Diferencia entre grupos
3000	3	4.386667	4000
2000	3	4.403333	4000
4000	3	5.71	2000, 3000

En la Figura 3.10 se muestra un diagrama donde se hace la comparación de los tres niveles de CO<sub>2</sub> suministrados, lo que nos lleva teniendo un impacto mayor en

el crecimiento celular de la microalga *Chlorella spp* en la dosis 2 % v/v de CO<sub>2</sub> seguida de 7% y 12%. En el caso de la luminosidad se evaluaron tres niveles, donde se tiene un mayor crecimiento celular es en niveles bajos de luminosidad con 4000 lux en comparación con 2000 lux.

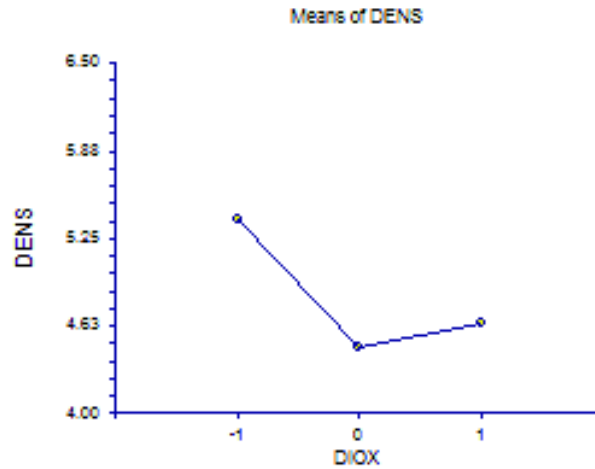


Figura 3. 10 Diagrama de evaluación de CO<sub>2</sub> sobre la densidad celular

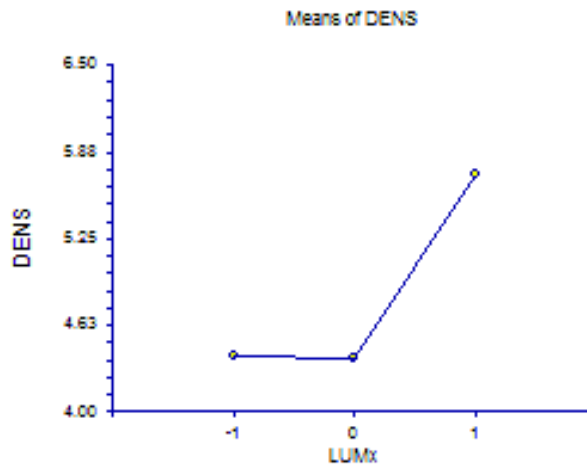


Figura 3. 11 Diagrama de evaluación de luminosidad sobre la densidad celular

Por otra parte, en la Tabla 3.5 se observan los resultados obtenidos en la prueba de media de cuadrados de Duncan, lo cual se demuestra que la luminosidad tiene mayor influencia en el crecimiento a mayor intensidad, es decir, se mostró que la luminosidad de 4000 lux tiene una diferencia significativa en comparación con las

luminosidades de 2000 y 3000 luxes con respecto al crecimiento celular de la microalga.

Teniendo estos resultados estadísticos con respecto a la influencia de la luminosidad y el CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento celular se optó por utilizar el 2 % v/v de CO<sub>2</sub> y 4000 lux de luminosidad para su implementación en fotobiorreactores tubulares con la microalga *Chlorella spp.*

### 3.3.2 Densidad celular y pH

Como se observa en la Figura 3.12, con respecto al crecimiento celular de las diferentes cinéticas, el FBR 7, 8 y 9 de 4000 lux tuvieron el mejor crecimiento celular con respecto a las demás, de la cual el FBR 7 (4000 Lux y suministro de CO<sub>2</sub> 2% v/v) tuvo el mejor crecimiento con  $5.8 \times 10^7$  cel/mL al final del proceso.

Con este resultado podemos decir que si se desea obtener altas concentraciones de biomasa y crecimiento celular, se recomienda utilizar las condiciones de 4000 Lux y suministro de CO<sub>2</sub> al 2% v/v.

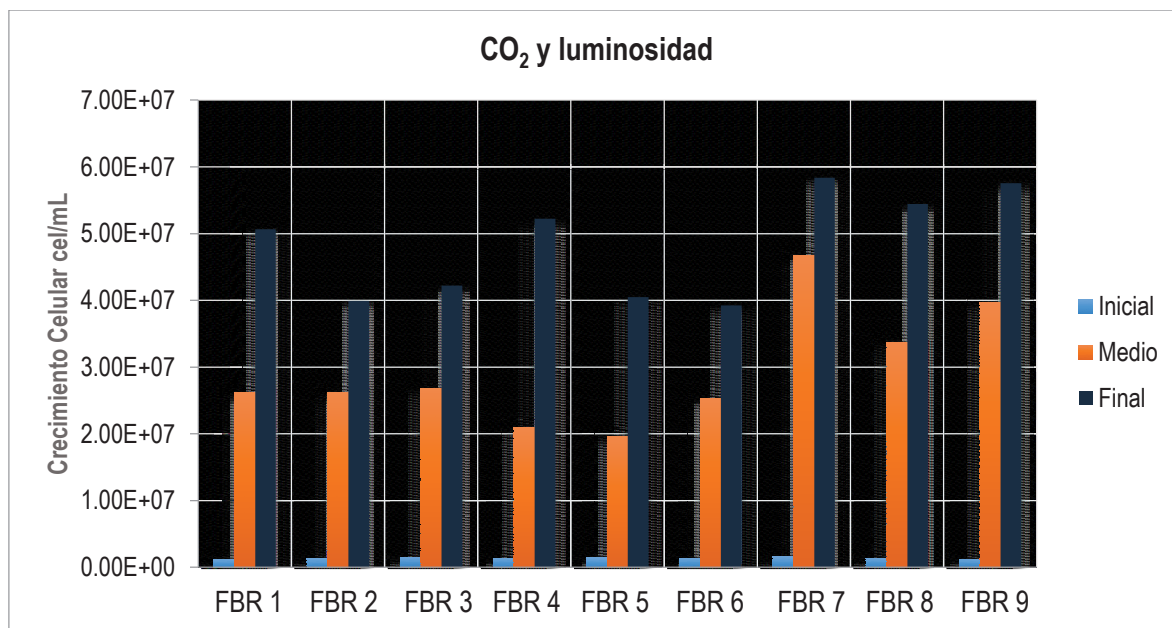


Figura 3. 12 Crecimiento celular en relación con el suministro de CO<sub>2</sub> y luminosidad

Por otra parte, en la Figura 3.13 se muestra el pH tomado de los FBR 1, 2, y 3 durante el proceso de suministro de CO<sub>2</sub> e iluminación donde se evaluaron las luminosidades de 2000 lux con las tres concentraciones de CO<sub>2</sub>. Aquí se muestra que a partir del día 11 los valores están por arriba del recomendable que es 8.5 y dentro del rango de los valores aceptables de 4-10 según los reporta Khalil ZI *et al.* (2010) citados en Gong *et al.* (2014) teniendo el mayor rendimiento de la biomasa bajo condiciones alcalinas (de 8.5 a 10).

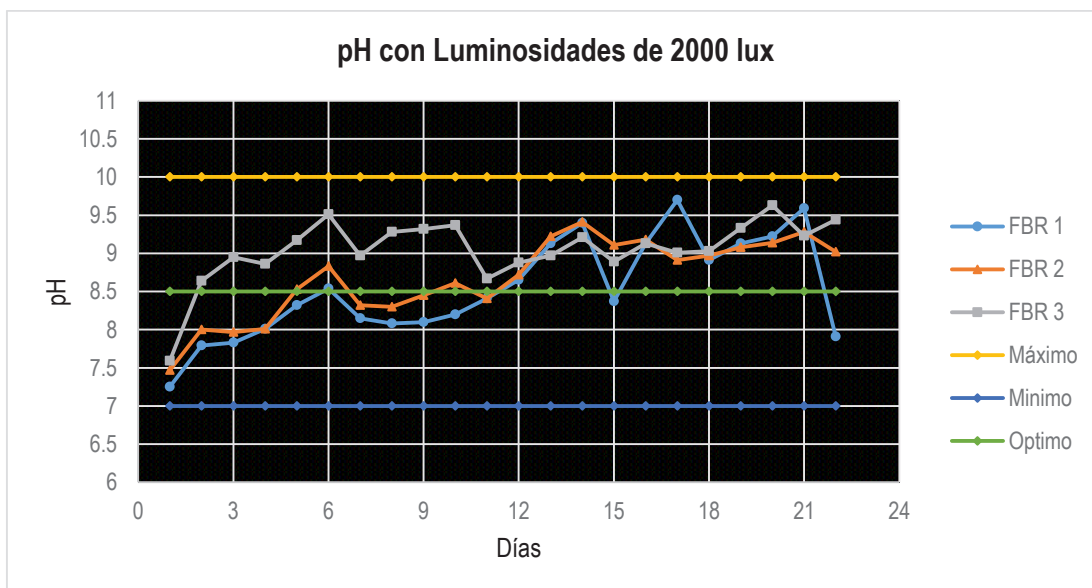


Figura 3. 13 Comportamiento de pH durante el suministro de CO<sub>2</sub> y luminosidad de 2000 lux

En la Figura 3.14 se puede observar el comportamiento del pH de los FBR 3, 4 y 5 donde se evaluó a una luminosidad de 3000 lux, estos se encuentran por arriba de pH 8.5 a partir del día 5 que es el considerado como recomendable para la mayor obtención de biomasa. En la Figura 3.15 se evaluó el pH de los FBR 7, 8 y 9 a luminosidades de 4000 lux, donde se mostró un pH dentro de los valores recomendados. Los 5 primeros días los FBR 7 y 8 se mantuvieron por debajo de un pH de 8.5, posteriormente se vio un incremento de los 3 FBR's dentro del rango de 8.5 a 10 para una mejor producción de biomasa. El FBR 9 tuvo un descenso en el día 10 con un pH de 8.2 donde posteriormente incremento sus valores de manera normal llegando de la misma forma a valores por arriba del

recomendable de 8.5. Según lo reporta (Benavente-Valdés *et al.*, 2012) los rangos de pH dentro de los cultivos se mantienen debido al suministro de aire enriquecido de CO<sub>2</sub> por lo que en estos cultivos reflejan valores entre 8-10, así se puede considerar que la elevación del pH pueda deberse al incremento de la edad del cultivo donde existe la acumulación de minerales y oxidación de nutrientes.

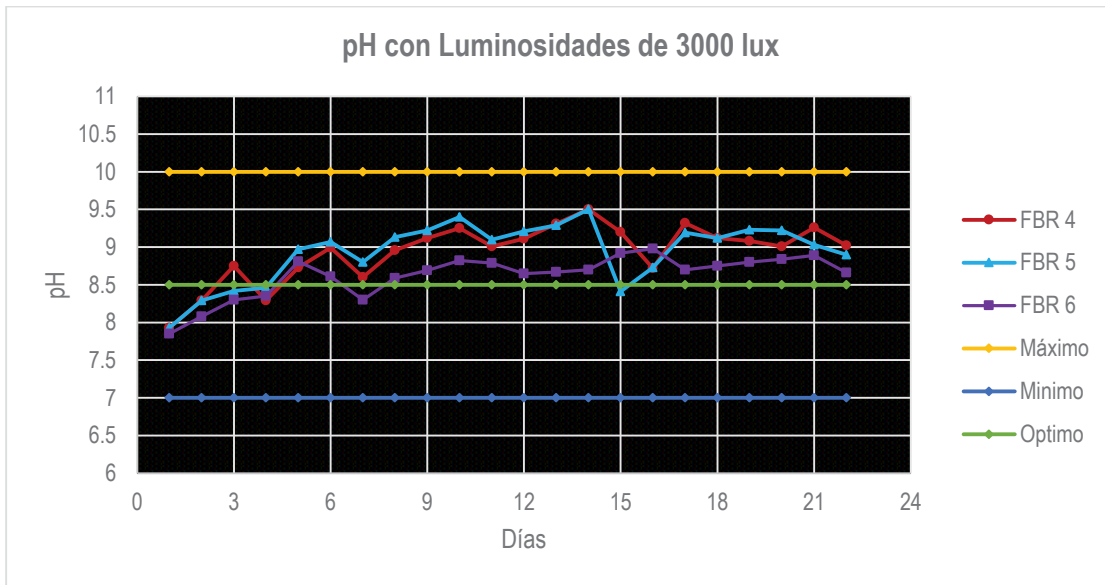


Figura 3. 14 Comportamiento de pH durante el suministro de CO<sub>2</sub> y luminosidad de 3000 lux

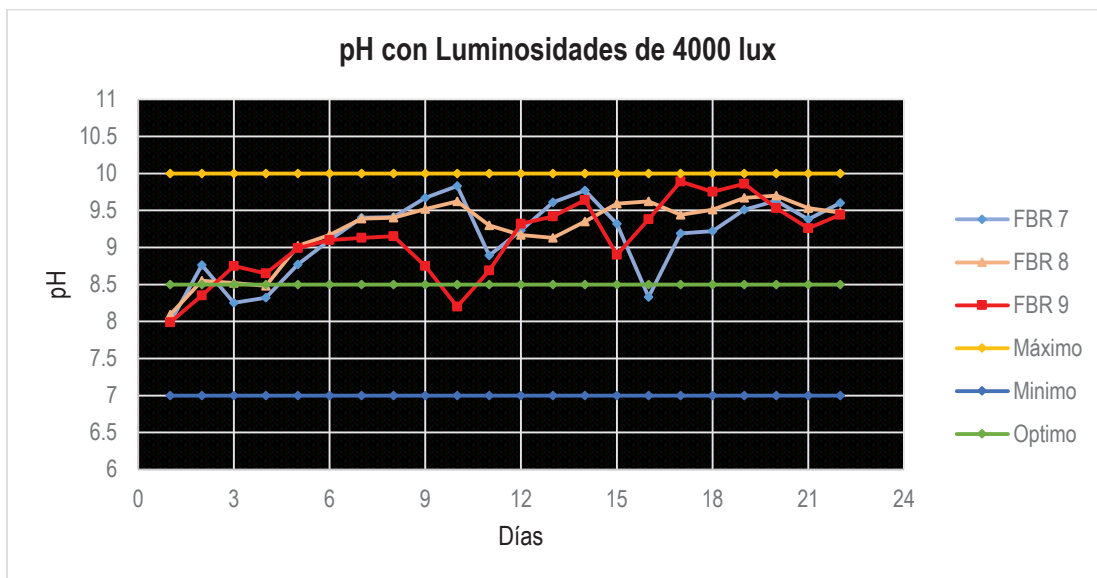


Figura 3. 15 Comportamiento de pH durante el suministro de CO<sub>2</sub> y luminosidad de 4000 lux

### 3.3.3 Oxígeno disuelto

Los valores de Oxígeno Disuelto (OD) en los FBR se mantuvieron en un rango de 3.2 y 16.1 mg/L. En la Figura 3.16 se ilustran los FBR 1, 2 y 3 con una luminosidad de 2000 lux donde se observa el incremento de OD, siendo el FBR 1 (2000 lux y CO<sub>2</sub> 2% v/v) el que tuvo mayor valor del 12.6 mg/L en el día 6 en comparación con los FBR 2 y 3. En la Figura 3.17 se muestran los FBR 4, 5 y 6 donde se evaluó la luminosidad de 3000 lux teniendo como resultado mayor de 14.4 mg/L de OD en el FBR 6 (3000 lux y CO<sub>2</sub> 12% v/v) en el día 6. Sin embargo, en la Figura 3.18 los FBR 7, 8 y 9 fueron los que tuvieron un mayor incremento de OD, los cuales fueron sometidos bajo iluminación de 4000 lux. El FBR 7 (4000 lux y CO<sub>2</sub> 2% v/v) fue el que alcanzó el máximo nivel 16.1 mg/L de OD.

Con esto podemos decir de manera indirecta que hay una buena fijación de CO<sub>2</sub> en el diseño experimental, lo que hace que haya un aumento en la producción de oxígeno dentro del sistema. Comparando con las condiciones del FBR 8 con una iluminación de 4000 lux y 7% v/v de CO<sub>2</sub>, llega de igual modo a una concentración máxima de OD de 16.1mg/L. Sin embargo el FBR 9 (4000 Lux y 12% v/v de CO<sub>2</sub>) el OD se ve disminuido. Observando esto se muestra que las mejores condiciones de obtención de biomasa y producción de oxígeno fueron a 4000 lux y una concentración de 2% v/v de CO<sub>2</sub>.

Aunque los valores de OD en la microalga se encontraron por arriba de los límites aceptables de acuerdo con (Muñoz-Peñuela *et al.*, 2011), quienes evaluaron el efecto del medio de cultivo en el crecimiento y producción de proteínas en *Chlorella vulgaris* monitoreando valores de OD. Ellos reportaron un rango de 6.2-7.5 mg/L de OD a temperaturas de 23 y 26.5 °C.

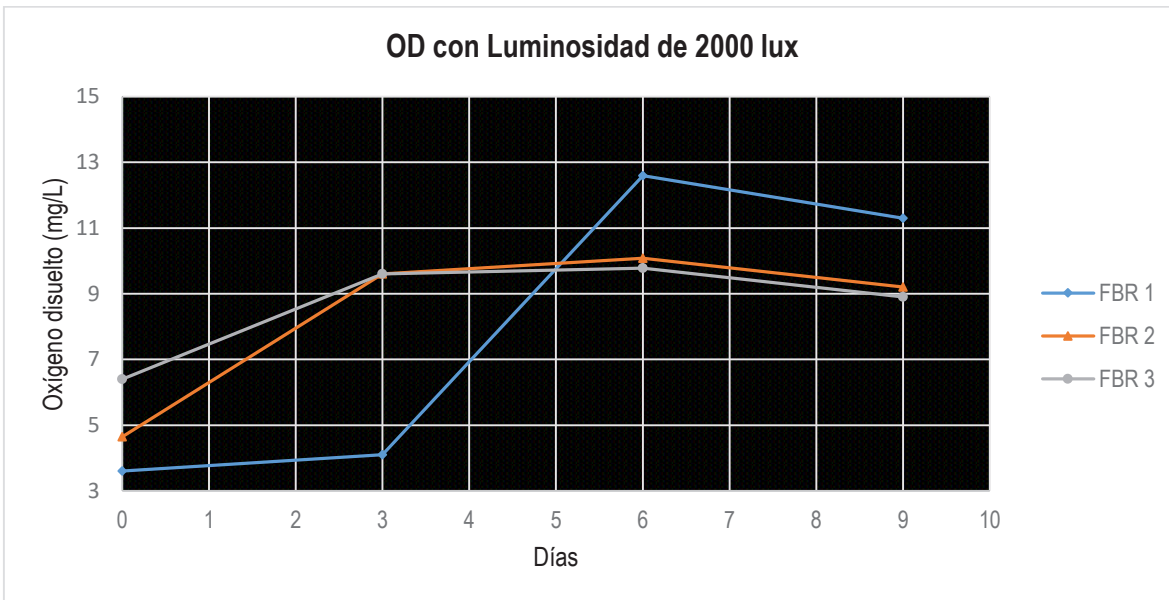


Figura 3. 16 Producción de oxígeno disuelto durante el suministro de CO<sub>2</sub> y luminosidad 2000 lux

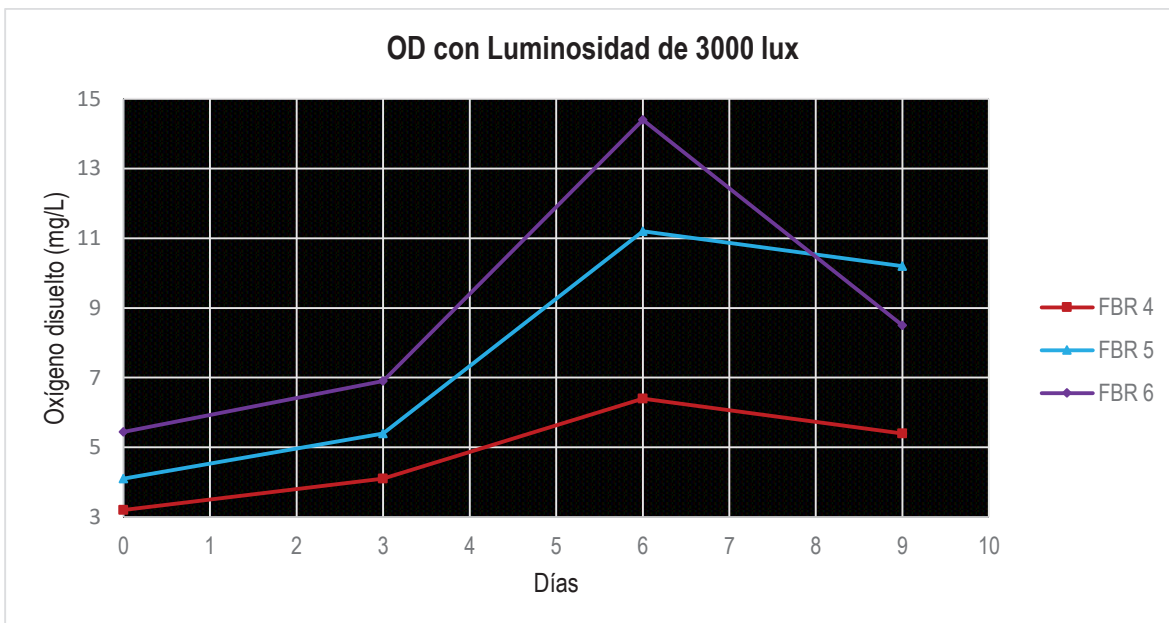


Figura 3. 17 Producción de oxígeno disuelto durante el suministro de CO<sub>2</sub> y luminosidad 3000 lux

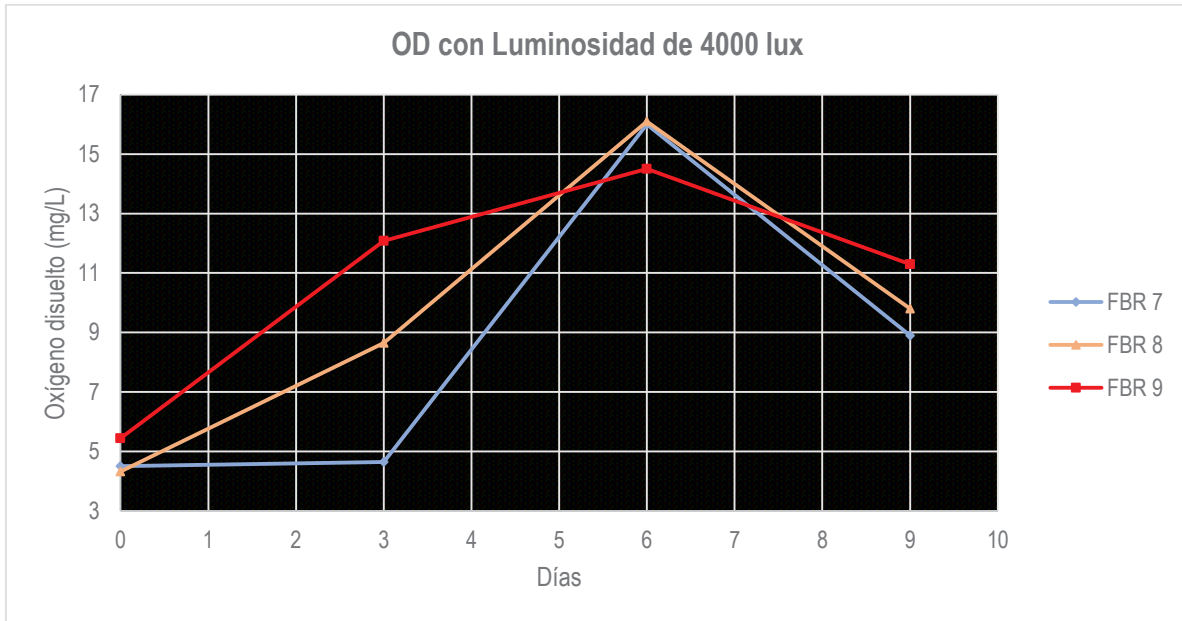


Figura 3. 18 Producción de oxígeno disuelto durante el suministro de CO<sub>2</sub> y luminosidad 4000 lux

Esto puede ser por lo que reporta (Rendón-Castrillón *et al.*, 2015) que cuando el oxígeno se encuentra a concentraciones mayores, se puede llegar a inhibir el crecimiento (fotorrespiración). Es necesario para evitar esto agitar el cultivo para que exista un intercambio con la atmósfera y el oxígeno pueda llegar al equilibrio. Aunque cabe destacar que el crecimiento celular tuvo un máximo de  $5.8 \times 10^7$  cel/mL ante esas condiciones.

### ■ Diseño de un fotobiorreactor tubular airlift a escala piloto

Para el diseño del fotobiorreactor airlift se emplearon distintas ecuaciones mencionadas en el capítulo anterior, por lo que se obtendrá el valor del *riser*, el *downcomer*, altura y volumen total.

Para determinar el diámetro del *riser* ( $D_r$ ) se tomó la ecuación (2.6). Considerando un valor de 6 in equivalente a 15.24 cm, como el diámetro del *downcomer* ( $D_d$ ) (es un diámetro propuesto de tubo de acrílico que se encuentren con esas medidas en el mercado) se obtiene el valor del  $D_r$ :

$$D_r = [0.6]15.24 \text{ cm} = 9.144 \text{ cm}$$

Valor que tendrá el tubo concéntrico del fotobiorreactor



Para la altura total del equipo (H) se toma el valor superior de este rango.

$$H = [6]15.24 \text{ cm} = \mathbf{91.44 \text{ cm}}$$

Para la realización del diseño se consideró tener una altura mayor para el fotobiorreactor por lo que se propuso una altura de 180 cm (1.8 m), por consiguiente el diámetro del *downcomer* tendría que aumentar, pero se pudo observar según reportó (Álvarez *et al.*, 2012) que el diámetro de los fotobiorreactores se ve limitado a una medida como máximo de 0.2 m (20 cm) y ésto para permitir la penetración de luz, al centro del tubo, donde el coeficiente de luz y la velocidad de crecimiento lineal del cultivo disminuyen con el crecimiento del diámetro. Por lo tanto el diámetro será de 15.24 cm con una altura de 180 cm. El diseño propuesto del fotobiorreactor airlift se encuentra en el Anexo C.

Para el cálculo del volumen total del *downcomer*

$$V_{Td} = \frac{\pi H D_d^2}{4} = \frac{\pi (180 \text{ cm})(15.24 \text{ cm})^2}{4} = 32834.64 \text{ cm}^3 = \mathbf{32.83 \text{ L}}$$

En el cálculo del volumen de operación ( $V_{op}$ ) se calcula mediante la ecuación 2.10 tomando un valor intermedio de los valores (0.8).

$$V_{op} \approx [0.7 \text{ a } 0.9]V_T = [0.8]32834.64 \text{ cm}^3 = 26267.71 \text{ cm}^3 = \mathbf{26.27 \text{ L}}$$

Ya establecidas las dimensiones del fotobiorreactor se realizó el cálculo de la relación área/volumen dando como resultado un valor de  $0.985 \approx 1$ .

### 3.4.1 Relación de proporcionalidad

Para el escalamiento del cultivo se buscó la similitud geométrica cilíndrica para que cumpliera con las proporciones aproximadas del fotobiorreactor. La escala proporcionalidad se calculó con la ecuación 1.4. Estos mientras se conserve la misma proporción ( $n_L$ ) entre el prototipo y el modelo la semejanza geométrica será cumplida. Por lo que en la Tabla 3.6 se muestran las proporciones de los recipientes utilizados y los resultados obtenidos fuero que cumplen con la similitud geométrica.

Tabla 3. 6 Razones de proporcionalidad ( $n_L$ ) geométrica

Dimensiones utilizadas en el escalamiento		$(n_L)$
FBR de 900 mL	L: 53 cm D: 9 cm	$(n_L) = 0.53$
FBR de 1500 mL	L: 100 cm D: 9.5 cm	$(n_L) = 0.55$
FBR de 26000 mL Escala piloto	L: 180 cm D: 15.24 cm	

L: longitud de fotobiorreactor (cm), D: diámetro del fotobiorreactor (cm)

### 3.4.2 Ingeniería conceptual

#### 3.4.2.1 Factibilidad técnica

La microalga *Chlorella spp* es un organismo fotosintético que ha demostrado tener un buen crecimiento celular, para esto se debe tener el control de las condiciones de cultivo, esto con el fin de reducir las elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> emitidas a la atmósfera y favoreciendo a la producción de O<sub>2</sub>.

Para esta problemática se propuso el desarrollo de los fotobiorreactores tubulares airlift ya que son equipos que facilitan el desarrollo de las microalgas. Además de ser un sistema compacto presenta altas transferencias de masa, buen mezclado, bajo consumo de energía, reducción de la fotoinhibición y mejor exposición a los ciclos de luz y oscuridad, lo que favorece la fijación de CO<sub>2</sub> suministrado. Estos fotobiorreactores se diseñaron para su implementación dentro del Instituto Tecnológico de Orizaba como parte de un proceso integral, se espera tratar el CO<sub>2</sub> generado lo que hará que la planta piloto cuente con un proceso autosustentable. Debido a lo anterior en planta piloto se cuenta con la tecnología disponible, área de trabajo y equipos que ayudaron a integrar el proceso en general.

### 3.4.2.2 Diseño de equipos y accesorios

En el anexo C se encuentran especificados cada uno de los diseños que incluyen:

- Fotobiorreactor airlift
- Base para el fotobiorreactor
- Bridas
- Gabinete de bombas
- Mini base para el soporte del fotobiorreactor
- Recirculación
- Soporte para recirculación
- Abrazaderas para fotobiorreactores
- Abrazaderas para tanque de CO<sub>2</sub>
- Suministro de CO<sub>2</sub>

### 3.4.2.3 Productos y Capacidad de la producción

El trabajar con *Chlorella spp* se tiene como productos finales los pigmentos, biomasa enriquecida con carbohidratos y lípidos según las condiciones a la que sea sometido el cultivo.

Los fotobiorreactores fueron llenados con medio de cultivo MBB (Anexo B se encuentra el modo de preparación) para el crecimiento de la microalga. En la Tabla 3.7 se muestra el volumen de operación, lo que nos muestra la capacidad de la producción del fotobiorreactor y el volumen total.

Tabla 3. 7 Volumen de operación calculado del fotobiorreactor

Tipo	Volumen total	Volumen de operación
Fotobiorreactor	32.86 L	26.27 L

### 3.4.2.4 Normativa y regulación

La normativa fue implementada en el diseño de los fotobiorreactores. Se utilizó la norma ISA (Instrument Society of America) que tiene como finalidad la

identificación funcional de los instrumentos. Este cuenta con un código alfanumérico que debe cumplir ciertas características.

ISA recomienda ciertas clases de líneas que representan el flujo del proceso, define símbolos para válvulas y libertad en la representación de equipos. Lo que permitió realizar el diagrama PI&D mostrados en el Anexo C. En el Anexo D vienen especificados la simbología que utiliza ISA y las reglas para utilizarse.

#### **3.4.2.5 Descripción general de instalación**

Primeramente dentro de la instalación se colocó la base de los fotobiorreactores junto con las lámparas utilizadas, dichas se colocaron en la parte central de la base y se fijaron. Se hizo la conexión necesaria al panel de control de operación para sistematizar las lámparas y las bombas. Las bombas se colocaron en la parte baja de la base de los fotobiorreactores. Seguido a esto se hizo la instalación de los fotobiorreactores que están soportados con una mini base. Después se sujetaron los fotobiorreactores con abrazaderas acorde a su diámetro con la base lateral para evitar el movimiento del mismo. Posteriormente se instalaron las conexiones de la recirculación y del suministro CO<sub>2</sub>. Finalizando con la instalación del tanque de CO<sub>2</sub> artificial así como las conexiones necesarias para su posterior utilización.

#### **3.4.2.6 Diagramas funcionales y del proceso**

En el Anexo C se integran los diagramas siguientes:

- Diagrama de flujo del proceso  
En este diagrama se ven reflejados gráficamente cada uno de los pasos de la planta piloto desde la obtención de la materia prima (lodo porcicola) para su implementación en el proceso de digestión anaerobia, seguido por la desulfuración del biogás, el almacenamiento del mismo, el generador eléctrico y finalmente los fotobiorreactores.
- Diagrama de bloques  
En este diagrama se destaca el nombre de cada una de las partes del proceso y para su comprensión.
- Layout de la planta piloto

En este diagrama se expresan las áreas que dispone cada uno de los equipos dentro de la planta piloto. Entre las que están: área del proceso de digestión anaerobia, área de columnas desulfuradoras, área de almacenamiento y generador eléctrico, y finalmente el área de los fotobiorreactores. En este también se integran las rutas de evacuación y las entradas y salidas de planta piloto.

### 3.4.3 Ingeniería básica y de detalle

#### 3.4.3.1 Cálculo de caudal y potencia de la bomba

En el Anexo E se realizó el cálculo de la potencia de la bomba y el caudal, dándonos como resultados los de la Tabla 3.8, lo que nos dice que se requiere una bomba con una potencia mayor de 40 W, esto es para que exista una buena recirculación en el sistema lo que favorecerá a una adecuada homogenización.

Tabla 3. 8 Potencia de la bomba y caudal

Bomba	Potencia teórica	Potencial real	Caudal
Peristáltica	32.48 W	38.218 W	0.0146 m <sup>3</sup> /s

Aunque se puede observar que el trabajo real de la bomba es mucho mayor al que puede tener, lo que nos dice que se requiere hacer un cambio de dicho equipo para obtener mejores condiciones de homogenización y prolongar la vida útil del equipo.

#### 3.4.3.2 Diagrama P&ID

En el Anexo C se encuentra el diagrama de tuberías e instrumentación en el cual se hace el desarrollo de la instrumentación correcta implementada en el proceso. En este diagrama viene especificados los accesorios y equipos utilizados visualizados de manera simbólica de acuerdo a la norma ISA. Dentro de algunos de los símbolos utilizados son los que se muestran en la Figura 3.19.




SIMBOLOGÍA			
	VÁLVULA MANUAL	MP	MEDIDOR DE PRESIÓN
	VÁLVULA CHECK	GE	GENERADOR ELÉCTRICO
MF	MEDIDOR DE FLUJO		LÁMPARA FLUORESCENTE
TH	TRAMPA DE HUMEDAD	BP	BOMBA PERISTÁLTICA

Figura 3. 19 Simbología de diagrama P&ID

En este diagrama se encuentra codificados los equipos con un sistema alfanumérico que permitirá la localización de cada una de las válvulas, medidores de flujo y de presión, equipos, entre otros.

### 3.4.3.3 Lista de equipos

Dentro de los equipos utilizados en planta piloto para el desarrollo del proceso se encuentran los de la Tabla 3.9:

Tabla 3. 9 Listado de equipos en fotobiorreactores

Nombre	Especificación	Función
Tanque de CO <sub>2</sub>	Capacidad: 20 kg Gas CO <sub>2</sub> industrial No inflamable	Tanque de almacenamiento de CO <sub>2</sub> para el suministro alternativo a las microalgas.
Bombas peristálticas	Velocidad: 127 rpm Bombeo: 190 L/h Potencia	Bombas que tiene la finalidad de recircular el sistema dentro del fotobiorreactor con el fin de homogenizar el medio
Lámparas fluorescentes luz blanca fría	Color: luz blanca fría Poder: 39.5 W Voltaje: 101 W Flujo lumínico: 2500 lm	Las lámparas suministran luz a las microalgas como una fuente de luz artificial
Panel de control de bombas	Operación manual: Sí Operación automática: Sí Semáforos de encendido: Sí Semáforo de apagado: Sí	Controlador del funcionamiento de las bombas

Cada uno de estos equipos fue incluido debido a que es utilizado dentro del proceso de fijación de CO<sub>2</sub> en fotobiorreactores.

### 3.4.3.4 Lista de accesorios y materiales

En la Tabla 3.10 se muestra los accesorios utilizados dentro de la instalación de los fotobiorreactores, soportes, abrazaderas, bombas y equipos en general dentro del proceso.

Tabla 3. 10 Lista de accesorios y materiales

Nombre	Cantidad (pz)	Medida
Tubo clase 16 (tuboplus)	9 m	22 mm (1/2")
Tubo cpvc (Flowguard Gold)	12 m	1/2"
Codos de 90°	6	1/2"
Codos de 45°	2	1/2"
Codos cpvc de 90 ° SCH 40		
Tee	2	1/2"
Reducciones	2	1/4 " x 1/2"
Conector hembra con espiga termofusión	2	1/2" x 1/2"
Tuerca unión mixta	4	1/2"
Válvula de esfera	5	1/2"
Válvula de PVC de tipo bola	4	1/2"
Válvula check	2	
Termofusor	1	1/2"
Tijera corta tubo	1	1"
Medidor de presión	1	cm <sup>2</sup> /kg
Medidor de flujo de biogás	1	m <sup>3</sup> /dL
Empaque	4	D: 21 cm
Brida (naylamid)	4	D: 21 cm

D: diámetro

### 3.4.3.5 Especificaciones técnicas de equipos y materiales

En el Anexo F se detallaron las especificaciones técnicas de las bombas, las lámparas y tuberías.

### 3.4.3.6 Especificaciones funcionales

En el apéndice G se detalló la forma de operación de cada uno de los equipos y para su correcto funcionamiento. Esto ayudará al buen manejo de los equipos y a evitar accidentes en el desarrollo de las actividades aplicando todas las medidas de seguridad.

### ■ Montaje del fotobiorreactor tubular airlift a escala piloto

En esta etapa se desarrolla el proceso de construcción del fotobiorreactor y la puesta en marcha de cada una de las partes que lo integran. Se implementó en la última sección de plantas piloto adecuando cada una de las áreas de los equipos como se propuso en el Layout del proceso. En la Figura 3.20 se muestra el área seleccionada donde sería posicionados los equipos. Las columnas desulfuradoras y el generador eléctrico ya integraban los equipos inventariados del Instituto Tecnológico de Orizaba, así que como nueva implementación de equipos para la integración al proceso fue la bolsa de membrana recolectora de biogás, el tanque de CO<sub>2</sub> industrial y los fotobiorreactores con los equipos que lo complementarían.



Figura 3. 20 Área seleccionada para implementación de los fotobiorreactores



### 3.5.1 Material de construcción del fotobiorreactor

Dentro de los materiales propuestos para la construcción del fotobiorreactor, el acrílico fue seleccionado ya que poseía mejores ventajas con un buen porcentaje de transmisión de luz y una buena conductividad térmica de 1 W /m K según los reporta (Fernández *et al.*, 2014). Dentro del catálogo de tubos de polietileno se buscó medidas que concordaran al diámetro calculado, teniendo como resultado que el *Dd* se pudo obtener a las medidas requeridas en contraste con el *Dr* que no hubo. Así que la medida adquirida para el *riser* fue de 7.3 cm de diámetro. En la altura del fotobiorreactor se propuso aumentar su tamaño ya que a la medida calculada investigaciones anteriores se habían trabajado, lo que se propuso fue aumentar la altura sin cambiar el diámetro, esperando buenos resultados con la nueva modificación. En la Tabla 3.11 se muestran los parámetros de diseño del fotobiorreactor de los cuales fueron utilizados para la selección del material.

Tabla 3. 11 Parámetros de diseño del fotobiorreactor

Parámetro	Unidad	Descripción	Medida
Dd	cm	Diámetro <i>Downcomer</i>	15.26
Dr	cm	Diámetro <i>Riser</i>	7.30
H	m	Altura	1.80
Hr	m	Altura <i>Riser</i>	1.53
Vop	L	Volumen de operación	26.27
Vtotal	L	Volumen total	32.86

### 3.5.2 Construcción del fotobiorreactor

Las especificaciones, características y diseños del fotobiorreactor son proporcionados a personal de confianza que nos apoyaron en la maquila de los fotobiorreactores.

Como primera parte se realizaron las bridas de naylamid, las especificaciones de diseño se encuentran en el Anexo C, con 6 barrenos configurando un hexágono. En estas mismas se le colocaron empaques de plástico que sirvió para darle esa hermeticidad al fotobiorreactor.

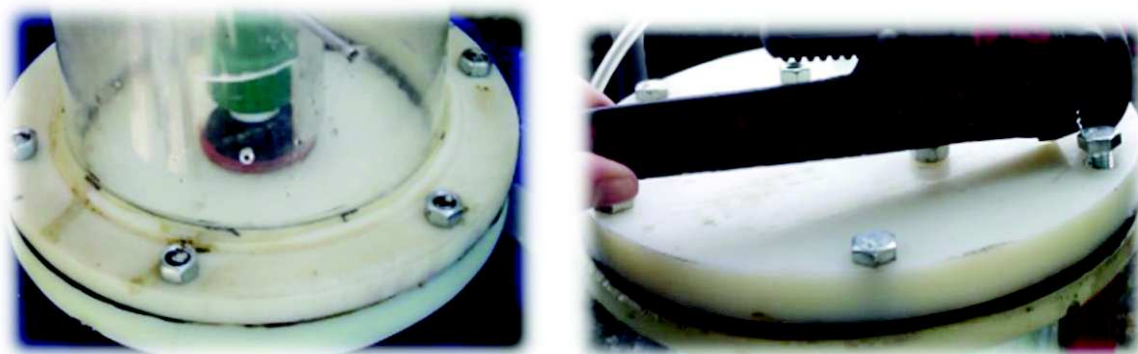


Figura 3. 21 Construcción de bridas e implementación en fotobiorreactores

En la Figura 3.21 se puede observar las bridas ya construidas, barrenadas y con la integración en medio de ella un empaque para el sellado del equipo.

Posterior a esto se recortó el *Downcomer* a una altura 1.80 m y el *riser* a una altura 1.53 m. El *riser* se le hizo recortes para que el medio de cultivo pudiera estar en constante ascenso y descenso. Después para su fijación se le adapto unos tornillos que harían que el riser se mantuviera fijo dentro del *Downcomer*, en la parte baja y superior del *riser*. Lo último se le hizo fue la instalación de la tubería en la base del fotobiorreactor para facilitar y promover la recirculación, y a su vez se barreno para la entrada del suministro de CO<sub>2</sub> en la Figura 3.22 podemos observar como quedo su configuración final.

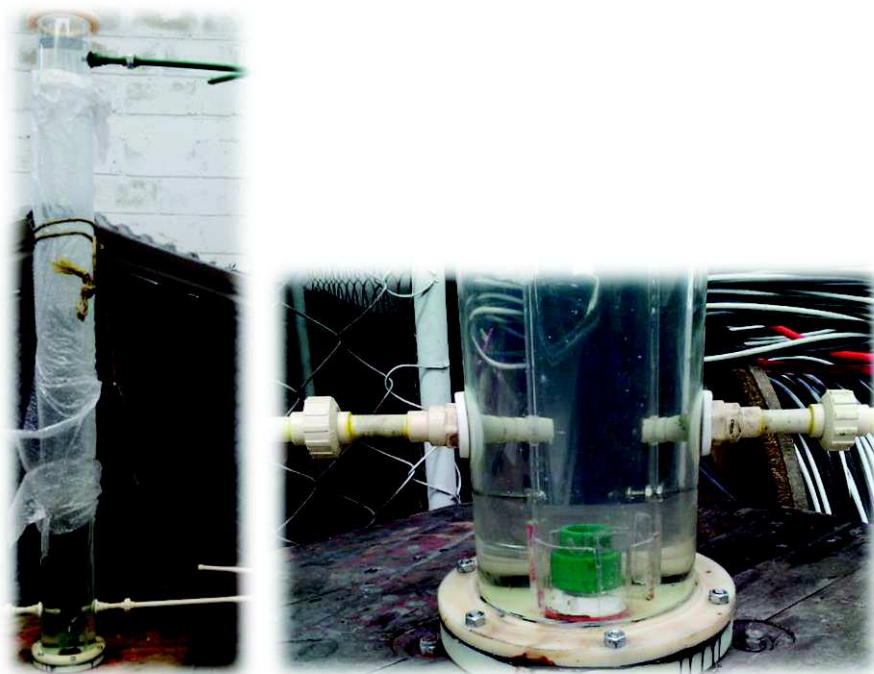


Figura 3. 22 Construcción de fotobiorreactor y adaptación de suministro de CO<sub>2</sub>

### 3.5.3 Instalación de la base para fotobiorreactores

Los fotobiorreactores requerían una base para ser soportados junto con el sistema de iluminación. En el Anexo C se muestra el diseño propuesto de la base. En la Figura 3.23 se muestra la base propuesta barnizada con una pintura para evitar la corrosión y por último una capa de pintura azul que permitió darle vista al diseño. Esta base fue empotrada a la pared para un mejor soporte y se tomó en cuenta el sistema de iluminación que estaría en la parte central y en la parte baja las bombas. Se dejó un espacio de 75 cm para el fácil acceso del personal a la hora de monitorear el fotobiorreactor.



Figura 3. 23 Base para fotobiorreactor, lámparas y control de bombas

#### **3.5.4 Instalación de lámparas y panel de control**

Las lámparas fueron instaladas en el centro de la base de los fotobiorreactores como se muestra en la Figura 3.23. Estas lámparas tienen una longitud de 2 m, teniendo un voltaje de 101 V, y de 39.5 W, emitiendo una eficiencia lumínica de 63 lm/W.

El controlador es un gabinete que permite tener sistematizado el proceso. Este cuenta con unos semáforos que indican cuando la bomba se encuentra en funcionamiento o si está detenida. A si mismo permite que el sistema pueda operarse de forma manual o automática según lo requiera la persona que la opere.

#### **3.5.5 Instalación de fotobiorreactores, soportes y abrazaderas**

Los fotobiorreactores fueron instalados una vez que la base y las lámparas se encontraban en el lugar correspondiente. En la Figura 3.24 se muestra como son instaladas las mini bases que permitirán darle más soporte al fotobiorreactor y las

abrazaderas que sujetaran a los mismos. Los diseños de los soportes y las abrazaderas se muestran en el Anexo C.



Figura 3. 24 Instalación de mini base, abrazaderas y fotobiorreactores

### 3.5.6 Instalación de bombas y tuberías de recirculación

Una vez instalados los fotobiorreactores se procedió a instalar la bomba con las conexiones de la recirculación. Para esto se requirió de tubería, conocida como tuboplus de 1/2", codos, llaves, válvula de esfera y tuercas unión para hacer las conexiones correspondientes de la recirculación. Se dejó una válvula de esfera en la parte inferior para el desfogue del sistema de cultivo y en la tubería de recirculación se colocó una llave para la toma de muestra y para que el muestrador tenga fácil manipulación. En la Figura 3.25 se observa cómo se hacen las instalaciones de las tuberías, ya que estas son unidas con un termofusor que tiene como principio unir dos piezas por medio de calor, también se observa como es instalado el soporte para la fijación de la tubería de recirculación. Este soporte se encuentra en Anexo C para visualizar las medidas del diseño.



Figura 3. 25 Instalación de tuberías y soporte para recirculación

### 3.5.7 Instalación de tuberías para suministro de CO<sub>2</sub>

En esta parte se utilizó tubería de ½" de pvc, codos de 90°, válvulas de tipo bola y válvulas check de cobre. Este diseño de se encuentra en Anexo C con especificaciones y medidas. En la Figura 3.26 se puede observar como esta configuradas las conexiones de manera que pueda haber un adecuado suministro y en el que también se pueden ver los accesorios que la incluyen. Esta tubería está conectada a dos fuentes, al tanque de CO<sub>2</sub> industrial que se tiene de reserva y el generador eléctrico donde las emisiones de CO<sub>2</sub> generadas con arrastradas para ser introducidas en los fotobiorreactores.



Figura 3. 26 Instalación de tuberías para suministro de CO<sub>2</sub>.

### 3.5.8 Pruebas hidráulicas y de operación

En esta última parte se realizaron pruebas hidráulicas que ayudaron a ver si en el sistema había alguna falla, fugas o si algún equipo e estaba operando de manera inadecuada. Así mismo esto servía para familiarizarse con la operación de los fotobiorreactores. En la Figura 3.27 se puede observar la planta piloto con cada uno de los equipos que conforman el proceso y posicionados en sus áreas designadas. Llegar a esta etapa permitió poder dar continuidad a la implementación de las mejores variables ambientales obtenidas a nivel laboratorio



Figura 3. 27 Pruebas hidráulicas en fotobiorreactores

#### ■ Implementación de las variables ambientales recomendables en el fotobiorreactor a escala piloto

Las mejores variables ambientales obtenidas a nivel laboratorio se implementaron a nivel planta piloto. La concentración fue de 1.5 mL de nutrientes en el MBB, 4000 Lux de luminosidad y 2% v/v de CO<sub>2</sub>.

Como parte inicial de la implementación se esterilizaron 26 L de MBB que fueron agregados a los fotobiorreactores junto con el inóculo de microalgas *Chlorella spp.* a un 3% del volumen total y 97% de MBB, esto es 0.75 L de microalga y 25.22 L de MBB. En la Figura 3.28 se puede observar cómo se cuantifican los litros que son ingresados al fotobiorreactor. Al término se procedió hacer el sellado de las bridas ya que es un sistema cerrado en que se operó.



Figura 3. 28 Implementación de variables ambientales en fotobiorreactores en planta piloto

Este sistema trabajó con fotoperiodos de 12:12, es decir, 12 h de luz y 12 h de oscuridad, adecuando a la microalga a su proceso natural de la fotosíntesis. El periodo de monitoreo fue de 45 días, tomando muestra para la cuantificación y determinación de su crecimiento. El bombeo y recirculación se mantuvieron durante el cultivo lo que favoreció al crecimiento y evitando su sedimentación.

## ■ Evaluación y caracterización de la biomasa producida a escala piloto

### 3.7.1 Densidad celular

En la Figura 3.29 se muestra el crecimiento celular que desarrolló la microalga *Chlorella spp* en el fotobiorreactor airlift en la planta piloto. Esta inició con una concentración celular de  $1.0 \times 10^5$  cel/mL, obteniendo un crecimiento máximo de  $2.1 \times 10^7$  cel/mL en el día 31. Otras investigaciones acerca de *Chlorella spp*, reportado por (Benítez *et al.*, 2015) mencionan que en el día 14 la microalga



alcanzó una densidad celular de  $2.6 \times 10^7$  cel/mL. Por otro lado (Robles-Heredia *et al.*, 2016) reportaron el crecimiento *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor airlift anular de  $1.18 \times 10^7$  cel/mL en un periodo de 4-6 días. Aparentemente no se presentó un inconveniente en el resultado de la densidad celular de la microalga, aunque la demora de su crecimiento en días se le puede atribuir la causa a una disminución extrema de la temperatura entre 7-11 ° C.

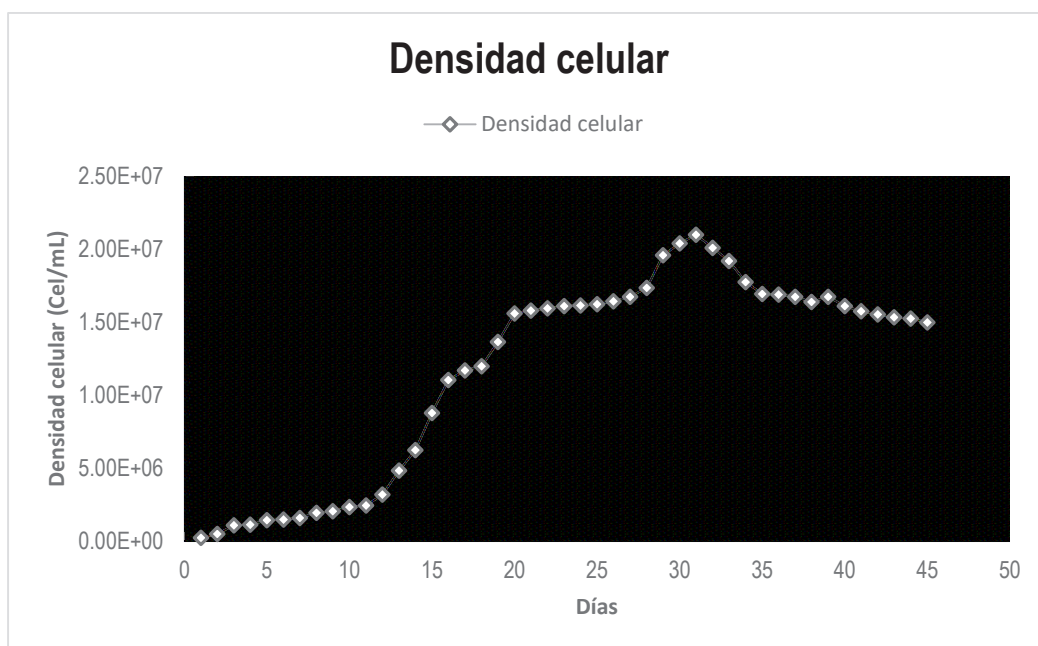


Figura 3. 29 Densidad celular del fotobiorreactor airlift a escala piloto

En los capítulos anteriores se mencionó que la temperatura de las microalgas debe ser entre 20 y 24 °C para obtener adecuado crecimiento, pero a temperaturas menores de 16 °C el crecimiento disminuye, mientras que a temperaturas mayores de 35 °C es letal para la mayoría de las microalgas.

(Zhang *et al.*, 2015) realizaron un experimento en el cual mostraron que la microalga *Chlorella spp.* era capaz de crecer en un rango de temperaturas de 12 °C a 25 °C, pero a una temperatura de 38 °C difícilmente crecía.

### 3.7.2 Tasa de crecimiento celular

Los valores que se obtuvieron en la densidad celular permitieron que se obtuviera la tasa de crecimiento celular ( $\mu$ ), el tiempo de duplicación (td) y el número de generaciones (ng). Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.12:

Tabla 3. 12 Crecimiento celular, tiempo de duplicación y generaciones en fotobiorreactor

$$x_1 = 2.5 \times 10^5$$

$$x_2 = 2.10 \times 10^7$$

$$\Delta t = 31$$

$\mu$ (Cel · mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	0.1429
tg dia <sup>-1</sup>	4.8506
ng dia <sup>-1</sup>	6.3923

### 3.7.3 pH y alcalinidad

Dentro del monitoreo de pH realizado al fotobiorreactor airlift durante 45 días, se puede observar en la Figura 3.30. Este inició con un valor de 7.88 de pH. Dentro de los primero 10 días se mantuvo dentro de los límites adecuados para la especie. A partir del suministro de CO<sub>2</sub> en el día 11, los valores de pH comenzaron a descender llegando a valores por debajo de 7. Estos valores hacen referencia a que existió un aumento en la formación de ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) en el sistema. Aunque el proceso normal de la conversión de CO<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O, tiene como producto final la producción de bicarbonatos (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>), se debe tener en cuenta que antes de este existió la producción de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Este proceso depende de la temperatura y anteriormente se mencionó que el fotobiorreactor se encontraba a temperatura ambiente en el rango de 7-11 °C donde solo el H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aumentaba provocando la disminución del pH y por ende la acidificación del sistema.

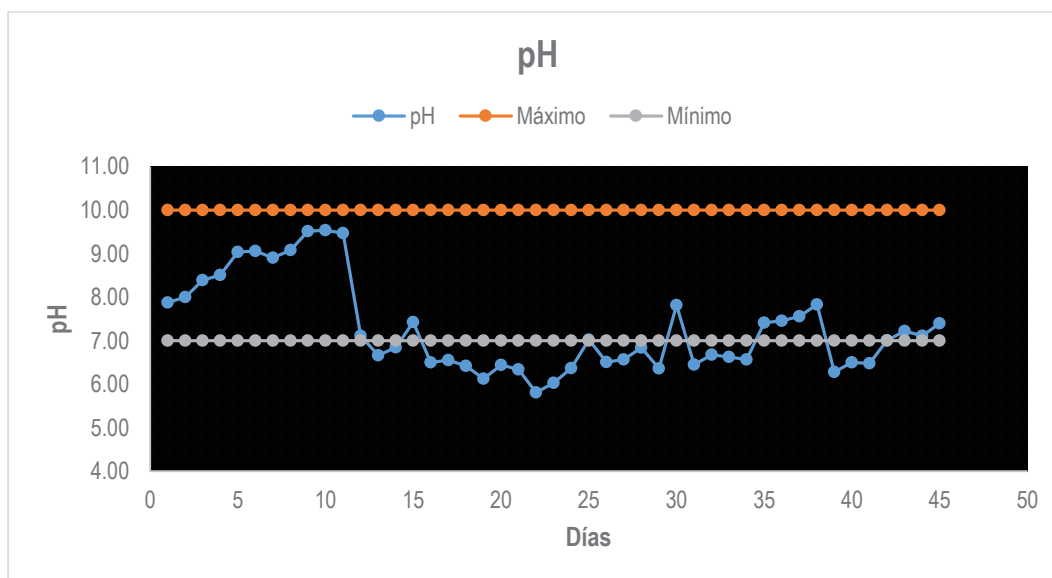


Figura 3. 30 pH en fotobiorreactor airlift en planta piloto

Quevedo, (2006) citado por Ovalle y Manrique, (2011) mencionan que uno de los factores más importantes en el cultivo es el pH y éste se ve afectado por la cantidad de CO<sub>2</sub> disuelto y la temperatura que a su vez controla la solubilidad de CO<sub>2</sub>, la actividad metabólica y la fuente de nitrógeno suministrada para su crecimiento.

Khalil ZI *et al.*, (2010) citados en Gong *et al.* (2014) demostraron que *Chlorella* es capaz de crecer en un amplio rango de pH (4-10) teniendo el mayor rendimiento de la biomasa bajo condiciones alcalinas (de 9 a 10).

Ante dicha problemática se buscó un sistema amortiguador de bicarbonato que reaccionara con el componente ácido del sistema, en este caso con el H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, utilizando NaOH. Este reaccionó con el sistema produciendo NaHCO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O, teniendo como resultado que el sistema se mantuviera dentro de los límites adecuados de pH y teniendo una buena producción de biomasa.

Los valores de alcalinidad en el fotobiorreactor se mantuvieron en el rango 50-500 mg de CaCO<sub>3</sub>. El aumento de la alcalinidad se relaciona con el aumento de la densidad celular del cultivo, observándose que el fotobiorreactor obtuvo un mayor incremento en la alcalinidad durante los días 20-40, en estos mismos días la densidad celular aumento como se muestra en la Figura 3.31.

Zhang *et al.*, (2014) plantearon la hipótesis de que el aumento de la alcalinidad después de 8 días de cultivo podría ser por el consumo de nitrato, la absorción de CO<sub>2</sub> y la exudación de las algas en la fase estacionaria.

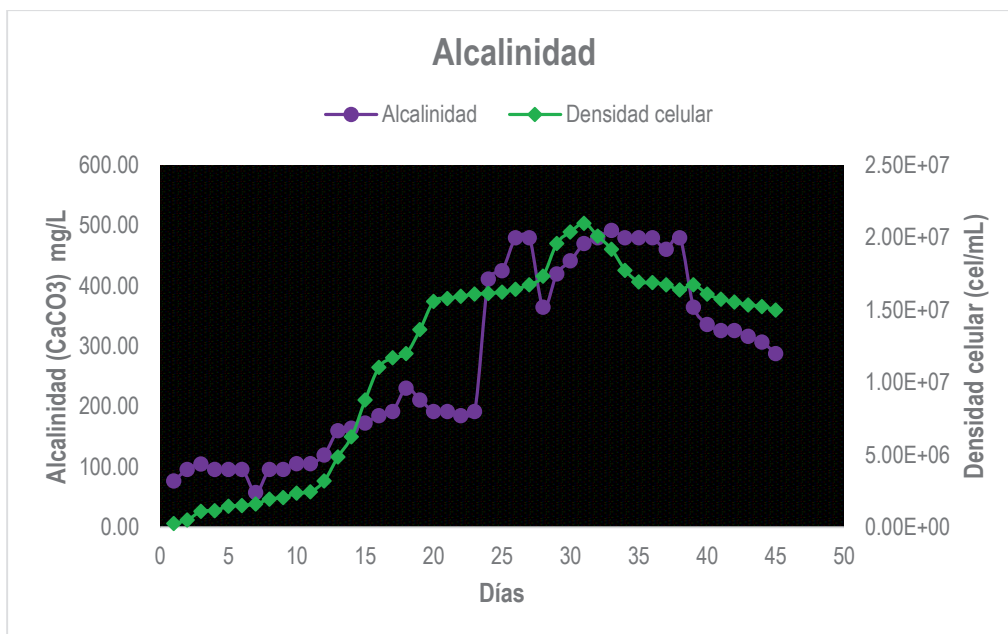


Figura 3. 31 Alcalinidad de fotobiorreactor airlift en planta piloto

### 3.7.4 Peso seco

El total de la cantidad de biomasa generada en el fotobiorreactor puede medirse en términos de peso seco por unidad de volumen. Para poder obtener la biomasa seca contenida se utilizaron 10 mL del cultivo, filtrando a vacío a través de un filtro Whatman GFC, posteriormente se sometió a un secado a 75 °C en una estufa durante 8 h. este se obtuvo por diferencia de pesos.

El peso seco de *Chlorella spp* en el fotobiorreactor airlift en plata piloto a los 31 días de cultivo fue de 2.18 g/L.

### 3.7.5 Lípidos, proteínas y carbohidratos

Los resultados de la caracterización de la biomasa de *Chlorella spp* en el fotobiorreactor airlift se muestra en la Tabla 3.13. El contenido de lípidos obtenidos fue de 14.56 %. Praveenkumar *et al.*, (2012) reportaron que *Chlorella sp.* Tuvo un contenido de lípidos de 31.12 % bajo condiciones de privación de nutrientes como el nitrógeno. Fernández *et al.*, (2012) citados por Robles-Heredia *et al.*, (2016)

reportan que la producción de lípidos a partir de microalgas no solo depende de la producción de biomasa alcanzada sino el contenido de aceite celular, esto es que cuando la microalga es sometida a estrés por limitación de nutrientes el crecimiento celular tiende a disminuir mientras el contenido de lípido aumenta. Así también Zhao *et al.*, (2014) obtuvo un 32 % en la producción de lípidos utilizando un co-cultivo de dos cepas de microalgas entre ellas *Chlorella sp.* lo cual favoreció su producción de biomasa y contenido lipídico. En contraste con la microalga *Chlorella vulgaris*, el mayor resultado de contenido de lípidos obtenido por Quintero Rangel, (2014) fue de 13.9 % sometiendo al cultivo a una limitación de nitrato de sodio, acetato de sodio y fosfato de sodio.

Ante dichas comparativas, los valores obtenidos de *Chlorella spp* son menores a los reportados por diversos autores, aunque se encuentra dentro de los porcentajes citados por Rodríguez *et al.*, (2016) los cuales varían entre 4-43 % [Rhodes, (2009); Saucedo, (2011); Montero *et al.*, (2012)] de producción de lípidos. Cabe destacar que dentro de los factores que afectan la producción y crecimiento de ácidos grasos que constituyen los lípidos se encuentra la composición del medio, la temperatura, la intensidad de iluminación, la relación del ciclo de luz/oscuridad y la tasa de aireación, etc.

Tabla 3. 13 Caracterización de la biomasa producida de *Chlorella spp* en fotobiorreactor airlift en planta piloto

Determinación	Resultado
Lípidos (%)	14.56
Proteínas (mg/L)	200
Carbohidratos (µg/mL)	135

El contenido de proteínas obtenido en este estudio fue de 200 mg/L. Barajas-Solano *et al.*, (2012) reportaron que *Chlorella vulgaris* tuvo una producción de total

de proteínas que iba desde 290 mg/L a 780 mg/L en concentraciones altas de acetato y nitrato de sodio. Lo que demuestran que la microalga a diferentes concentraciones de nitrógeno y acetato es variable en términos de contenido de proteínas, es decir, un medio con baja fuente de nitrógeno y acetato producirá poco contenido proteico. Quintero Rangel, (2014) reportó un valor de 953 mg/L en *Chlorella vulgaris* sometido a concentraciones altas de acetato de sodio y nitrato de sodio lo que beneficia la producción de proteínas.

La producción de carbohidratos fue de 135  $\mu\text{g/mL}$ . Rosales *et al.*, (2008) evaluaron la cianobacteria *Synechococcus sp.* Obteniendo un contenido proteico de 530 mg/L y su producción de carbohidratos fue de 408.94  $\mu\text{g/mL}$ , estos resultados están dados en función de baja irradiancia. Por otro lado, Quintero Rangel, (2014) obtuvo un contenido de carbohidratos de 1008  $\mu\text{g/mL}$  sometiendo al cultivo a la variación de acetato de sodio a los 15 días, donde se relaciona que el contenido de carbohidratos está relacionado con la concentración de acetato en el medio. Los resultados obtenidos son bajos en comparación con otros autores ya que el rango promedio de la microalga *Chlorella vulgaris* en la producción de carbohidratos es del 12-17 %, es decir, de 244-172  $\mu\text{g/mL}$  (Becker, 2004).

### 3.7.6 Clorofilas

Una de las características de *Chlorella spp* es que poseen Clorofila *b*, incluso se han identificado grupos de microalgas que tienen clorofila *c*, *d* y *e* [Camacho *et. al.*, (1987)]. Además una de las características es que posee una pared celular de celulosa muy rígida la cual requiere de un proceso de molienda para romper la pared celular y se pueda extraer la mayor cantidad de pigmentos.

En este estudio se obtuvo de contenido de Clorofila *a* 24.32 mg/L y clorofila *b* 19.15 mg/L presente en *Chlorella spp* en fotobiorreactores airlift como se puede observar en la Figura 3.32.

Ortega *et al.*, (2004) reportan que la producción de clorofilas está relacionado con una baja intensidad luminosa. Rosales *et al.*, (2008) trabajaron con *Dunaliella viridis* con variación de iluminación, obteniendo como resultado de Clorofila *a* 40.44 mg/L a baja iluminación. Por otro lado, Marchetti *et al.*, (2013) señalaron que

en un cultivo con luz LED y un bajo suministro de CO<sub>2</sub>, el contenido de carbohidratos disminuye y el de proteínas aumenta. Mientras que para la clorofila a y la actividad fotosintética el contenido es mayor. La microalga *Chlorella vulgaris* contiene una alta cantidad de clorofila por gramo, se ha reportado hasta 30 mg/g, en un proceso de mejoramiento de secuestro de CO<sub>2</sub> en fotobiorreactores a escala laboratorio (Barajas-Solano *et al.*, 2012).

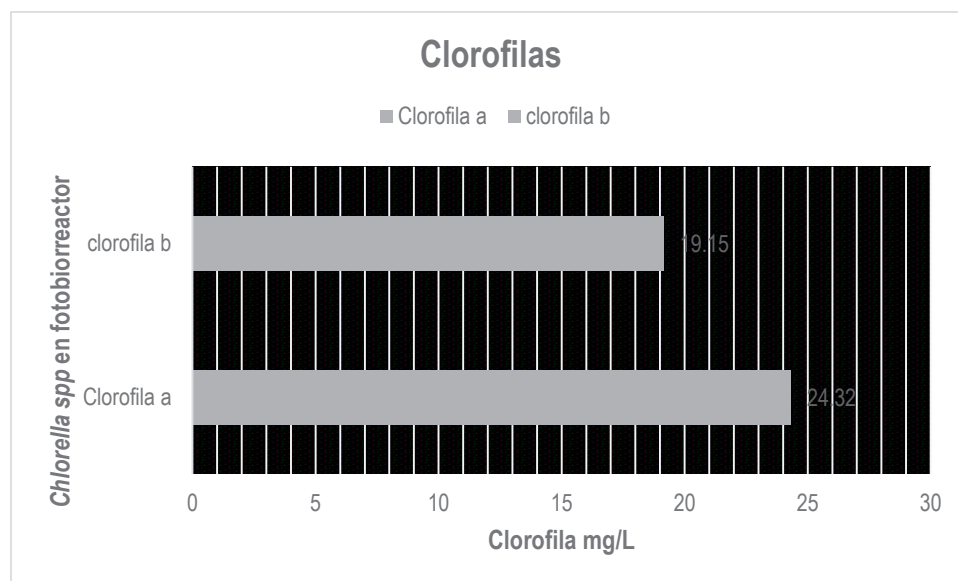


Figura 3. 32 Clorofilas en fotobiorreactor airlift en planta piloto

### 3.7.7 Tasa de fijación y porcentaje de CO<sub>2</sub> consumido

Durante el suministro de CO<sub>2</sub> en el fotobiorreactor airlift se evaluó la productividad volumétrica durante el crecimiento de la microalga *Chlorella spp* como se observa en la Tabla 3.14. La mayor productividad volumétrica obtenida fue entre los días 32-34 donde se obtuvo el mayor crecimiento celular. Jacobo-Lopes *et al.*, (2009) reportaron que las variaciones de productividad volumétrica y el crecimiento celular están en función de los ciclos de luminosidad a los que se expone el cultivo. Ellos obtuvieron productividades de 0.301 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> con la cianobacteria *Aphanothece microscopica Nägeli* utilizando fotoperiodos 12:12 h mismos que fueron utilizados en esta experimentación. Quevedo *et al.*, (2008) señalaron que cuando las productividades obtenidas son bajas y se pretende comparar con las de otros investigadores, resulta que estas últimas son mayores. Esto se debe a

que los experimentos se realizaron en cultivos en continuo y semi-continuo, donde las productividades son mayores comparadas con un cultivo por lotes.

La tasa de fijación de la microalga *Chlorella spp* en el fotobiorreactor airlift se muestra en la Tabla 3.14, datos que se encuentran relacionados con la biomasa producida. Estos datos tomaron en cuenta los días en el que se suministró CO<sub>2</sub>. El mejor resultado obtenido en la tasa de fijación fue en el día 32, con un valor de 0.6297 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

Jacobo-López *et al.*, (2009) obtuvieron una tasa de fijación de 0.936 con la cianobacteria *Aphanothece microscopica Nägeli* trabajando con fotoperiodos 4:20 h en sistema batch y con un suministros de 15% v/v CO<sub>2</sub>.

García-Cubero, (2014) trabajó con la microalga *Chlorella spp* obteniendo una tasa de fijación de CO<sub>2</sub> de 0.6 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> resultados muy similares a los obtenidos en esta investigación.

Tabla 3. 14 Productividad volumétrica y tasa de fijación de CO<sub>2</sub> en el fotobiorreactor

Día cultivo	<i>P</i> <sub>max</sub>	<i>P</i> CO <sub>2</sub>
	Productividad volumétrica <i>mg · L<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup></i>	Tasa de fijación <i>g · L<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup></i>
11	0.38021	0.00000
13	0.41799	0.05424
15	0.44567	0.02695
17	0.44225	0.12195
18	0.44082	0.05290
21	0.43737	0.29498
23	0.52631	0.02868
25	0.56760	0.24095
27	0.63369	0.22088
29	0.82014	0.53448
31	0.87483	0.23264
32	0.93872	0.62965
34	0.99386	0.51625



En la Tabla 3.15 se muestran los resultados del análisis cromatográfico y la alcalinidad que se tomó del fotobiorreactor airlift, aquí se muestra como el CO<sub>2</sub> se encuentra disuelto en el cultivo y como fue consumido con ayuda de la microalga *Chlorella spp.*

El suministro del CO<sub>2</sub> se inició en la fase exponencial del cultivo para maximizar el crecimiento de la microalga. Se determinaba la velocidad de flujo del tanque de CO<sub>2</sub> y el tiempo de suministro, haciéndose los cálculos correspondientes al 2% v/v seleccionado. En el primer día se hizo una prueba cromatográfica para determinar el porcentaje de los componentes del aire dentro del fotobiorreactor antes del suministro de CO<sub>2</sub>. Este obtuvo un 47.07 % de aire, 41.97% de nitrógeno y 10.96 % era de oxígeno. Este se dejó dos días para dejar que la microalga pudiera absorber la mayor cantidad posible CO<sub>2</sub> en el fotobiorreactor.

Tabla 3. 15 Resultados de análisis cromatográfico durante el monitoreo del fotobiorreactor airlift en planta piloto

Día cultivo	Suministro de CO <sub>2</sub>	% CO <sub>2</sub>	% O <sub>2</sub>	%N <sub>2</sub>	%Aire	%CO <sub>2</sub> consumido	Alcalinidad mg CaCO <sub>3</sub> /L
11	A	0.000	10.961	41.969	47.070	0.000	105.60
13	D	3.539	12.519	29.691	54.251	0.000	160.00
15	A	1.649	13.833	34.681	49.836	53.400	172.80
17	D	7.520	7.964	27.617	56.899	0.000	192.00
18	A	3.273	16.993	37.099	37.155	56.470	230.40
21	D	18.394	9.940	20.621	51.044	0.000	192.00
23	A	1.486	13.154	58.788	26.572	91.920	192.00
25	D	11.577	9.135	36.487	42.800	0.000	425.14
27	A	9.506	8.930	34.712	46.852	17.880	480.00
29	D	17.774	7.554	32.919	43.278	0.000	420.00
31	A	7.253	47.665	35.854	9.228	59.100	470.40
32	D	18.293	10.581	40.364	30.761	0.000	480.00
34	A	14.167	11.348	32.317	42.169	22.550	480.00

A: antes del suministro; D: después del suministro

Antes de la cuantificación de CO<sub>2</sub>, a partir del tercer día se determinó que hubo un consumo de 53.4 % de CO<sub>2</sub>, posteriormente se pudo observar que en la mayoría de las otras determinaciones consumía más del 50%. Así, el mayor consumo de CO<sub>2</sub> fue 91.92% en el día 23 y en el último día se mostró con un valor de 22.55% que fue bajo en comparación con los anteriormente resultados obtenidos. También se tomó en cuenta el pH, ya que este influyo para que hubiese una buena fijación, ya que este empezó a descender cuando se suministró el CO<sub>2</sub> influenciado por la temperatura.

La alcalinidad se mantuvo con valores de 105 a 192 mg CaCO<sub>3</sub>/L hasta el día 21, incrementando posteriormente a valores de 425 a 480 mg CaCO<sub>3</sub>/L, lo cual indicaba la presencia de carbonatos en el medio de cultivo y la disolución de CO<sub>2</sub>. En la Figura 3.33 se aprecian los porcentajes producidos de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en el fotobiorreactor, estos valores muestran las variaciones de dichos gases observándose que cuando hay mayor porcentaje de CO<sub>2</sub> hay una disminución de O<sub>2</sub> y viceversa. La mayor producción obtenida de O<sub>2</sub> fue en el día 31 con un 47.665% y una disminución de CO<sub>2</sub> con un valor de 7.253%, lo cual nos dice que hubo un mayor consumo de CO<sub>2</sub>.

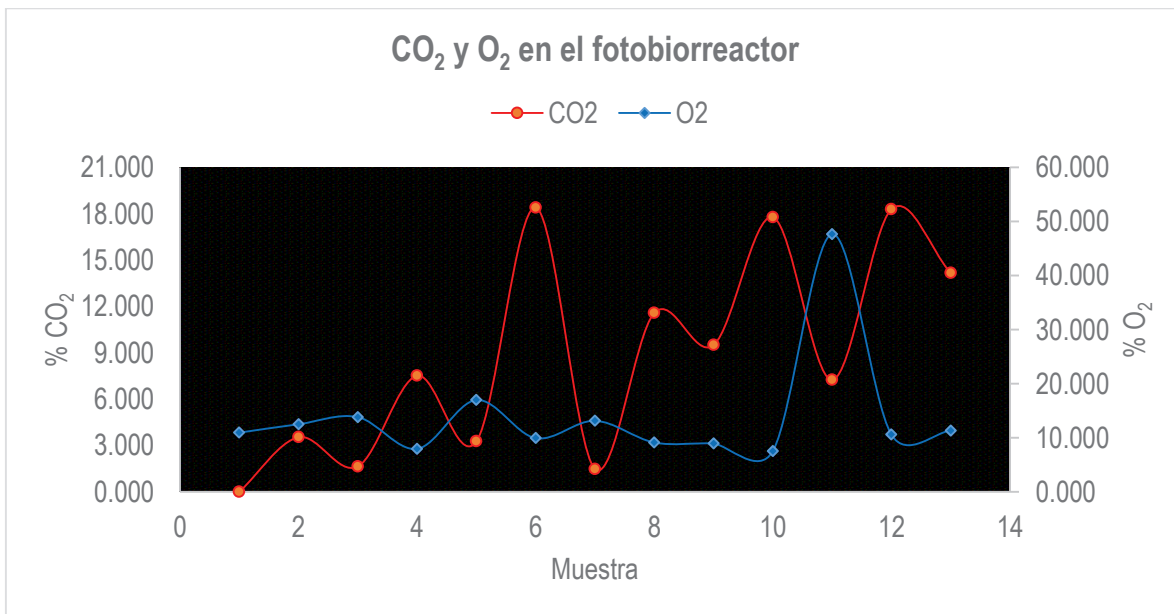


Figura 3. 33 Porcentajes de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en el fotobiorreactor airlift

Benavente-Valdés *et al.*, (2012) reportaron que *Chlorella spp* es capaz de tolerar concentraciones de hasta 40% v/v. Barajas-Solano *et al.*, (2012) utilizaron *Chlorella vulgaris* para estudiar el efecto de la inyección continua de CO<sub>2</sub> sobre la productividad de la biomasa. Utilizaron una temperatura de 23 °C, un fotoperiodo 12:12 h y un flujo continuo de CO<sub>2</sub> del 2.3 y 3.8 % v/v, obteniendo mayor productividad de biomasa en concentraciones altas de 3.8 % v/v.

Sung k *et al.*, (1999) citados por Oscanoa *et al.*, (2015) experimentaron con *Chlorella spp* RK-1 obteniendo óptimos resultados con suministros del 5% v/v de CO<sub>2</sub> incrementando su productividad en la biomasa de un 10 %. Oscanoa *et al.*, (2015) evaluaron distintos tiempos de inyección de CO<sub>2</sub> los cuales fortalecieron la fase de crecimiento exponencial llegando a una densidad poblacional 30% sobre lo establecido en esta fase.

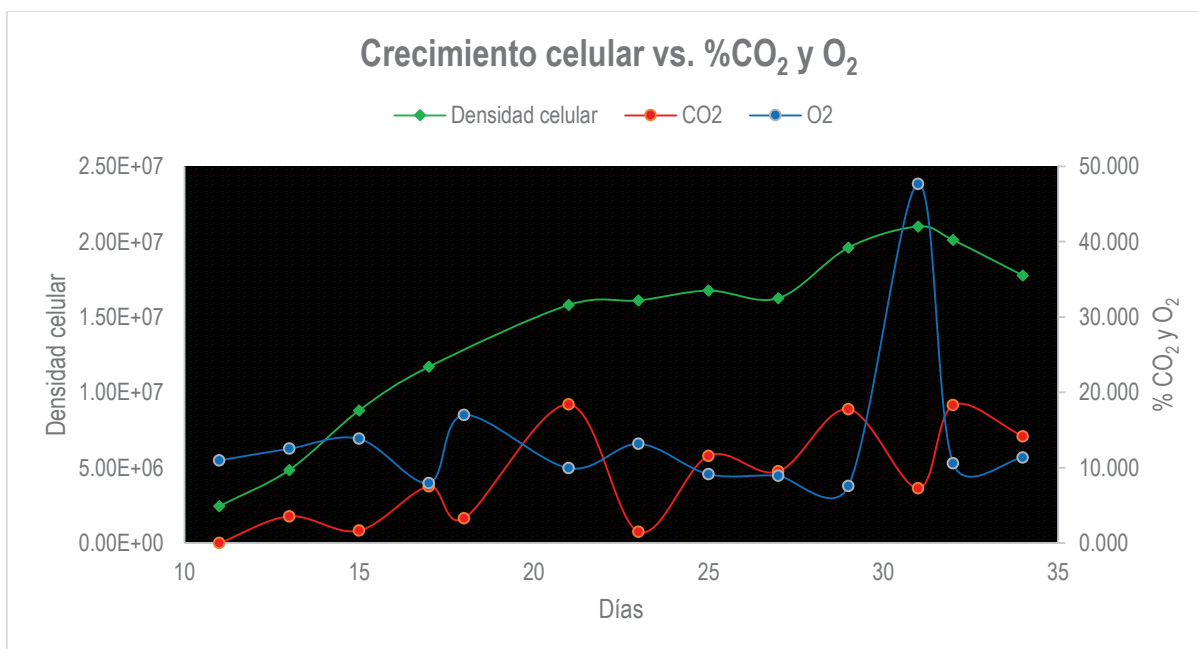


Figura 3. 34 Comparativo del crecimiento celular y el porcentaje de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>

Tang *et al.*, (2011) evaluaron la capacidad de *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella pyrenoidosa* para fijar CO<sub>2</sub> y acumular lípidos en el intervalo de 0.03 % - 50 % de CO<sub>2</sub> y encontraron que las dos microalgas pueden crecer en todo el intervalo estudiado, pero la mayor productividad de biomasa se presentó a 5 % y 10 % de

CO<sub>2</sub> para *S. obliquus* y *C. pyrenoidosa* respectivamente, además de que altos niveles de CO<sub>2</sub> (> 30 %) favorecieron la acumulación de lípidos.

En la Figura 3.34 muestra el crecimiento celular con respecto a los porcentaje de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en el fotobiorreactor, se observa como fue incrementando *Chlorella spp* en la fase exponencial con ayuda del suministro de CO<sub>2</sub>, porcentaje de dicho gas se ve disminuido, favoreciendo a la producción de O<sub>2</sub>. Esto contribuye a lo que diversos autores han reportado, donde evalúan el efecto de CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento celular, obteniendo buenas productividades de biomasa, sin embargo esto varía según la especie y altas concentraciones pueden inhibir el crecimiento celular.



## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se concluye lo siguiente:

- El MBB (Medio Bold Basal) presenta una influencia directa en la densidad poblacional de *Chlorella spp.* pero también en su contenido de carbohidratos, lípidos, proteínas y clorofilas, ya que a mayor concentración de nutrientes (1.5 mL) contenidos en el Medio Bold Basal mayor es la producción de lípidos (16.1 %) y clorofilas (*a*: 30.619 y *b*: 18.623 mg/L). Se observó que una menor concentración de nutrientes (0.5 mL) favoreció el contenido de carbohidratos; a una dosis intermedia de nutrientes (1 mL) obtuvo una mejor producción de proteínas (260.61 mg/L). Cabe destacar que las diferencias entre las concentraciones fueron mínimas, por lo que es importante desarrollar estudios que identifiquen la cantidad máxima de nutrientes que la microalga pueda consumir y su relación con la cantidad producida de carbohidratos, lípidos, proteínas y clorofilas ante dichas concentraciones .
- Los resultados sugieren que cuando mayor es la luminosidad, al menos hasta las intensidades que fueron evaluadas (2000, 3000 y 4000 lux), la concentración celular es la mayor obtenida en estas condiciones experimentales, sin embargo aún no se detectan regiones que delimiten el crecimiento poblacional. Aún son necesario estudios para determinar los límites en los cuales la luminosidad permita el desarrollo poblacional.
- Se demostró que las condiciones de luminosidad que permiten el máximo crecimiento poblacional obtuvieron las mejores concentraciones de carbohidratos (69.75 µg/mL) y proteínas (374.2 mg/L), esto se debe a que dentro del medio del cultivo existe mayor contenido de fosfatos, nitratos y una fuente de carbono, lo que favorece la producción de carbohidratos y

proteínas. En contraste, la producción de clorofilas fue menor (*a*: 7.02 y *b*: 1.99 mg/L) y esto se debe a que la producción de clorofilas *a* y *b* está en función de la intensidad luminosa por lo que distintas investigaciones señalan que a menor intensidad mayor contenido de clorofilas.

- Por otro lado, el MBB aportó 1.5 mL de nutrientes que permitió un alto contenido poblacional, concentración que supera a la reportada por otros autores. Aunado a eso las condiciones de luminosidad fueron de 4000 lux lo que también permitió una máxima densidad poblacional de  $5.8 \times 10^7$  cel/mL, y como consecuencia del exceso de población y del exceso de nutrientes, hay un aparente resultado mayor de lípidos (52 %), sin embargo no se atribuye a una delimitación de nutrientes sino por el exceso de biomasa.
- En las condiciones de mayor concentración poblacional con un máximo de  $5.8 \times 10^7$  cel/mL, a una luminosidad de 4000 lux, un suministro de CO<sub>2</sub> del 2% v/v y a una dosis de nutrientes de 1.5 mL, se obtiene la mayor cantidad de Oxígeno Disuelto (OD) en el medio. Este puede ser considerado como un indicador indirecto del CO<sub>2</sub> que se está fijando para promover las reacciones de fotosíntesis que dan lugar a la generación de oxígeno como liberación del conglomerado bacteriano.
- Se realizó el diseño de un fotobiorreactor con configuración *airlift*, este cuenta con un sistema de recirculación. El equipo tiene una altura de 180 cm y 15.26 cm de diámetro y un volumen de 32 L. Así mismo se realizaron los diseños y planos por medio del software *Edraw Max 7.0*, basados en la normativa ISA. Posteriormente se construyó y se implementaron las variables recomendables en planta piloto.
- Al ser evaluado el fotobiorreactor a nivel planta piloto con las condiciones recomendables seleccionadas se pudo apreciar que la especie tuvo un máximo crecimiento de  $2.1 \times 10^7$  cel/mL, valores cercanos a los obtenidos a

nivel laboratorio. Este resultado fue a consecuencia de que el cultivo fue expuesto a una temperatura ambiente de 7-11 °C, por lo que esta cepa tiene mejores resultados entre valores por arriba de 12-25 °C. Se detectó una relación directa con la temperatura, ya que resulta limitante del crecimiento poblacional de la microalga *Chlorella spp.*

- El contenido de los carbohidratos obtenidos a nivel laboratorio (135 µg/mL) fue superior al esperado, sin embargo comparado con distintos autores se mantiene por debajo de lo normal (244-172 µg/mL). Así a su vez el contenido de proteínas, lípidos y clorofilas se mantuvieron dentro de los rangos esperados comparados con los resultados a nivel laboratorio.
- De acuerdo con la adición de CO<sub>2</sub>, el cultivo de la microalga *Chlorella spp* obtuvo un máximo consumo de 91.92 % y un mínimo de 17.88 %. Los valores de pH mostrados durante el experimento se encontraron dentro del rango aceptable para el crecimiento de la microalga, aunque valores mayores a 8.5 de pH han mostrado mayores rendimientos en condiciones alcalinas. El descenso de valores obtenidos pudieron ser causados por la temperatura ambiental presente cuando se desarrolló la experimentación.
- En general, la biomasa de microalga *Chlorella spp.* obtenida en el fotobiorreactor *airlift* presenta valores cercanos a los obtenidos a nivel laboratorio, por lo que el presente trabajo es viable aplicando las condiciones evaluadas en este estudio.



## Recomendaciones

De acuerdo con los resultados obtenidos, se recomienda:

- Llevar a cabo distintas pruebas en las que se someta la microalga *Chlorella spp* a condiciones de estrés para evaluar en contenido bioquímico y así ser implementado en distintas áreas con valor agregado como la generación de biocombustibles.
- Diseñar e implementar una mampara fotoiluminada que promueva una área de mayor temperatura circundante en el fotobiorreactor
- Realizar una evaluación hidrodinámica del cultivo lo que incluye el tamaño de la burbuja y la transferencia de masa del gas en el sistema.
- Realizar el análisis elemental de la microalga utilizando el analizador de CHNS/O para conocer la composición total de carbono absorbido.
- Implementar un detector electrónico de CO<sub>2</sub> en el fotobiorreactor que permita evaluar las concentraciones de manera rápida.



**ANEXO A**

---

---

## ANEXO A

### Cuantificación de Clorofilas

La determinación de la concentración de pigmentos fotosintéticos nos permite estimar, la biomasa y la capacidad fotosintética del fitoplancton. La calidad, distribución y relación entre las distintas clases de pigmentos nos indica el estado fisiológico de la comunidad y la composición del fitoplancton en cuanto a grupos algales.

La concentración de pigmentos varía ampliamente y depende del metabolismo algal y de factores físico-químicos como la luz, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes.

Los pigmentos algales consisten principalmente en clorofilas (*a*, *b*, *c*) y carotenoides (carotenos y xantofilas). Para estimar su concentración el método consiste en extraer, los pigmentos mediante un solvente orgánico y leer en un espectrofotómetro la absorción de luz a la longitud de onda específica para cada pigmento.

Pesar 0.05 gramos de muestra (o la cantidad equivalente en ml a su peso seco) y triturar con una pequeña cantidad de arena, para romper la pared celular y favorecer la extracción de los pigmentos.

#### **Coloque en un tubo para centrifuga 0.05 g de muestra.**

En caso de la especie *Chlorella Spp.* triturar la muestra con una pequeña cantidad de arena, para romper la pared celular y favorecer la extracción de los pigmentos antes de colocarla en el tubo para centrifuga.

#### **Agregar 10 mL de metanol.**

#### **Centrifugar a 5000 rpm durante 20 minutos.**

Leer absorbancia de acuerdo a las siguientes fórmulas:

Para *Chlorella Spp.* que contiene clorofila *a* y *b* expresada en µg/mL:

$$\text{Clorofila } a = 12.7 * A_{663} - 2.69 * A_{645}$$

$$\text{Clorofila } b = 22.9 * A_{645} - 4.68 * A_{663}$$

### Azúcares totales por Dubois

(Carbohidratos)

El método de Dubois se basa en la formación de un compuesto coloreado con máximo de absorbancia de 490 nm, por reacción del fenol con los glúcidos (azúcares y sus metil derivados, oligosacáridos y polisacáridos solubles), en presencia de ácido sulfúrico concentrado. El color es amarillo, naranja o rosado y el color es proporcional a la concentración.

La curva de calibración se realiza utilizando en un rango de 10-100 µg/mL o mg/L

Reactivos:

- 1.- Fenol al 5% (p/v)
- 2.- Ácido sulfúrico concentrado 95%
- 3.- Solución de glucosa de 100 mg/L

\*Evitar dejar ácido fuera de las celdas, mancha dedos y ropa.

\*Recuerde trabajar sobre hojas de papel.

Tabla AA. 1 Curva estándar de glucosa

Concentración de glucosa mg/L	0	10	20	30	40	50	60	80	100
Agua (µL)	1000	900	800	700	600	500	400	200	0
Sol. De glucosa 100mg/L(µL)	0	100	200	300	400	500	600	800	1000

Procedimiento para macro ensayo

- 1.- Tomar 1 mL de solución de analito o de blanco o de solución estándar y depositarlo en un tubo de ensayo de vidrio liso y largo.

- 2.- Adicionar, al tubo con la muestra, 0.5 mL de solución de fenol, 5%.
- 3.- Poner los tubos en baño de hielo para enfriar, una vez fríos,
- 4.- Adicionar de forma rápida 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. (Tener cuidado, la reacción es exotérmica muy violenta).
- 5.- Mezclar en vórtex.
- 6.- Dejar reposar de 10 a 15 min.
- 7.- Poner en baño de agua a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 8.- Transferir a celda y leer a 495 nm.
- 9.- Disponer los residuos en un bote específico para fenol sulfúrico.



**ANEXO B**

## ANEXO B

Tabla AB. 1 Soluciones Stock para MBB (Medio Bold Basal).

Disolucion Stock	Reactivo (s)	Peso (g)
1	Nitrato de Sodio ( $\text{NaNO}_2$ )	25.0
2	Cloruro de calcio di hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	2.5
3	Sulfato de magnesio hepta hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	7.5
4	Fosfato mono basico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	17.5
5	Fosfato dibasico de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	7.5
6	Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	2.5
7	Sulfato ferroso hepta hidratdo ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) + 100 $\mu\text{L}$ de $\text{H}_2\text{SO}_4$	0.498
8	Acido Borico ( $\text{H}_2\text{BO}_3$ )	1.142
9	EDTA	5.0
	Hidroxido de potasio ( $\text{KOH}$ )	3.1
10	Sulfato de zinc hepta hidratado ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.882
	Cloruro de magensio tetra hidratado ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.144
	Oxido de molibdeno ( $\text{MoO}_2$ )	0.071
	Sulfato de cobre penta hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0.157
	Nitrato de cobalto hexa hidratado [ $\text{Co}(\text{NO}_2)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ]	0.049

**Nota:** Preparar 100 ml de cada una de las soluciones stock, conforme a la tabla.

Una vez preparadas las 10 soluciones Stock, se realizará MBB a tres concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 mL; en un matraz de balón aforado con volumen de 1 L se agrega 0.5 mL de cada una de las soluciones Stock y se afora. Para las concentraciones 1.0 y 1.5 mL se agregará dicho volumen a cada matraz y se afora.



**ANEXO C**



**ANEXO C**

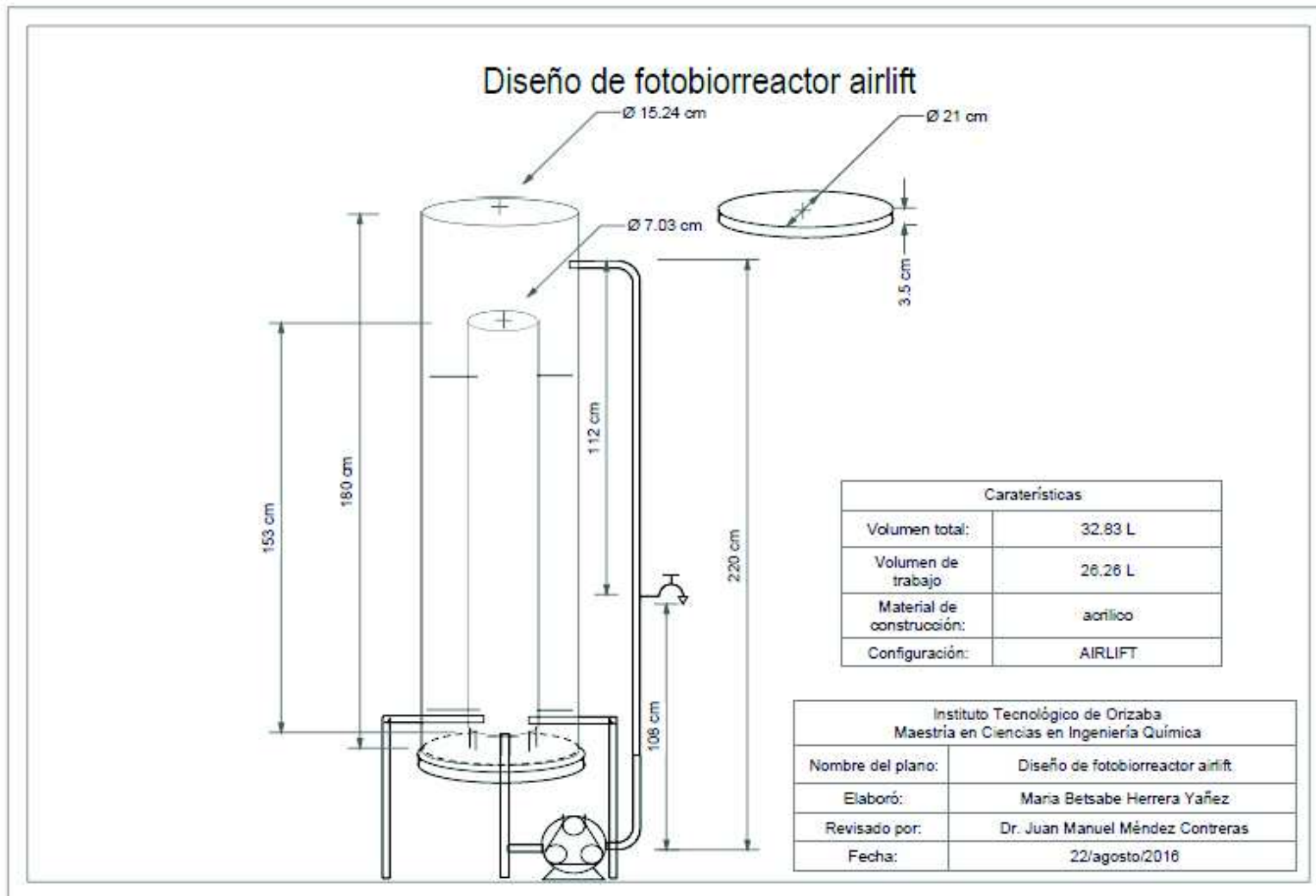


Figura AC. 1 Diseño de fotobiorreactor airlift

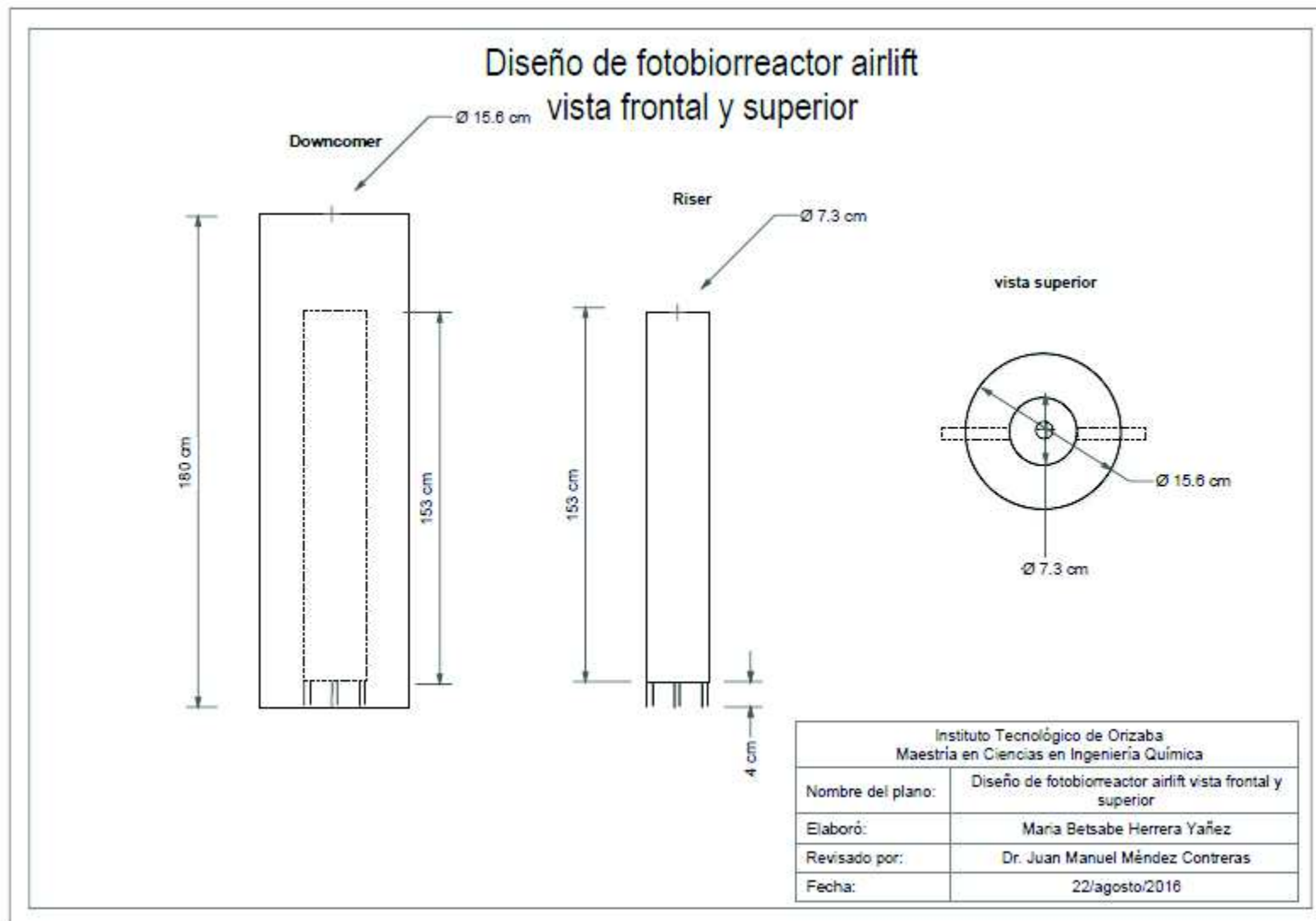


Figura AC. 2 Diseño de fotobiorreactor airlift vista frontal y superior

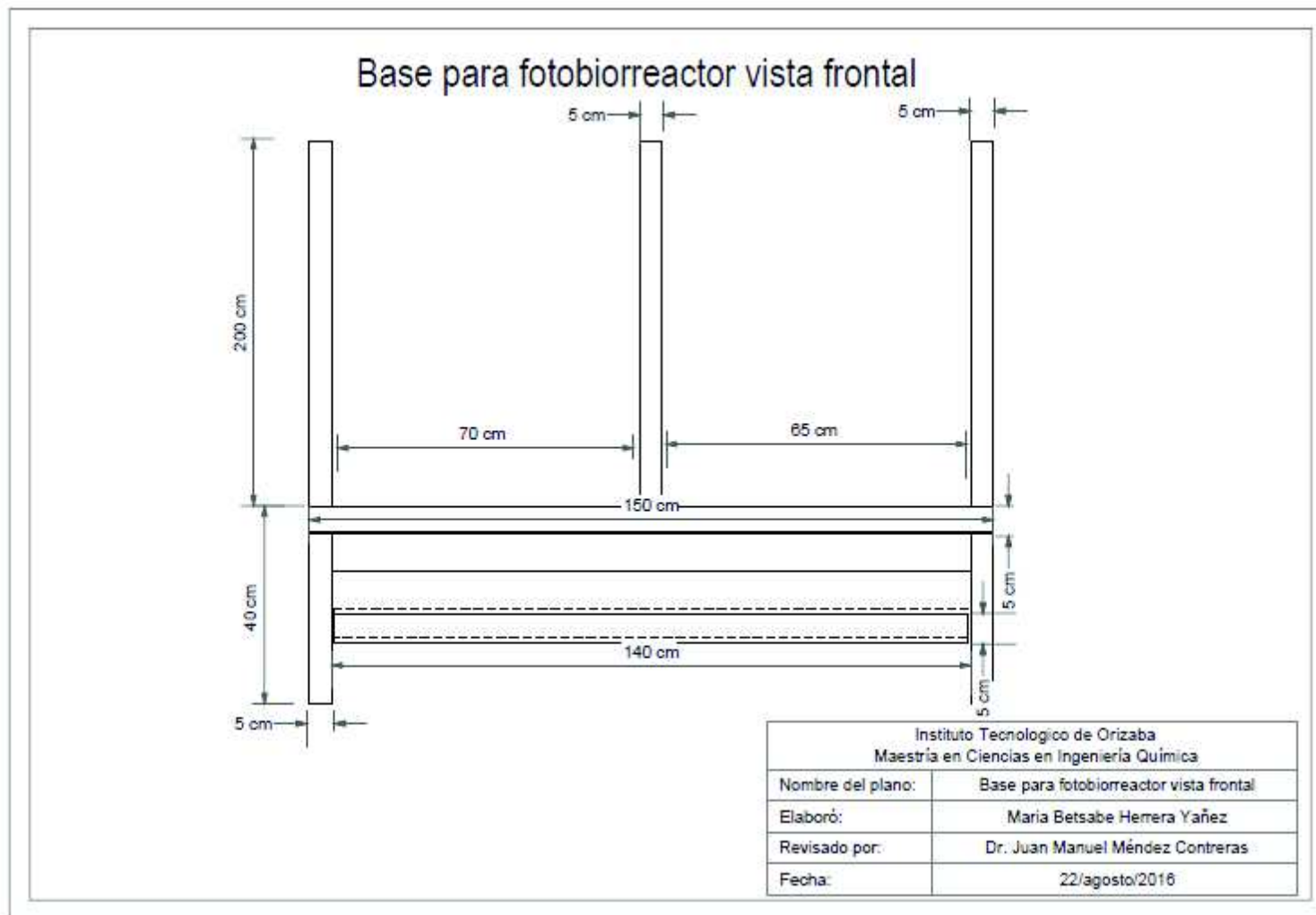


Figura AC. 3 Base para fotobiorreactor vista frontal

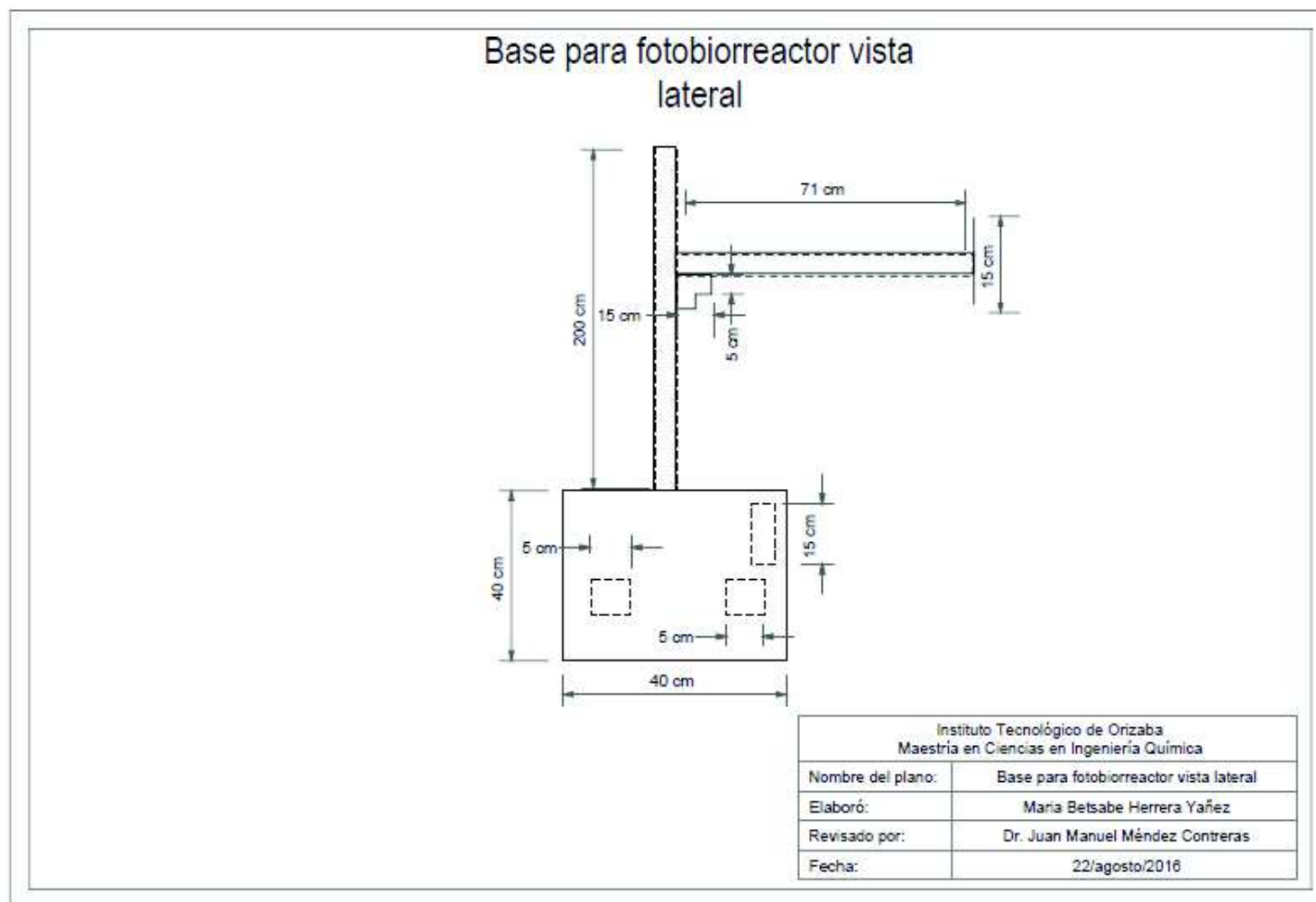


Figura AC. 4 Base para fotobiorreactor vista lateral

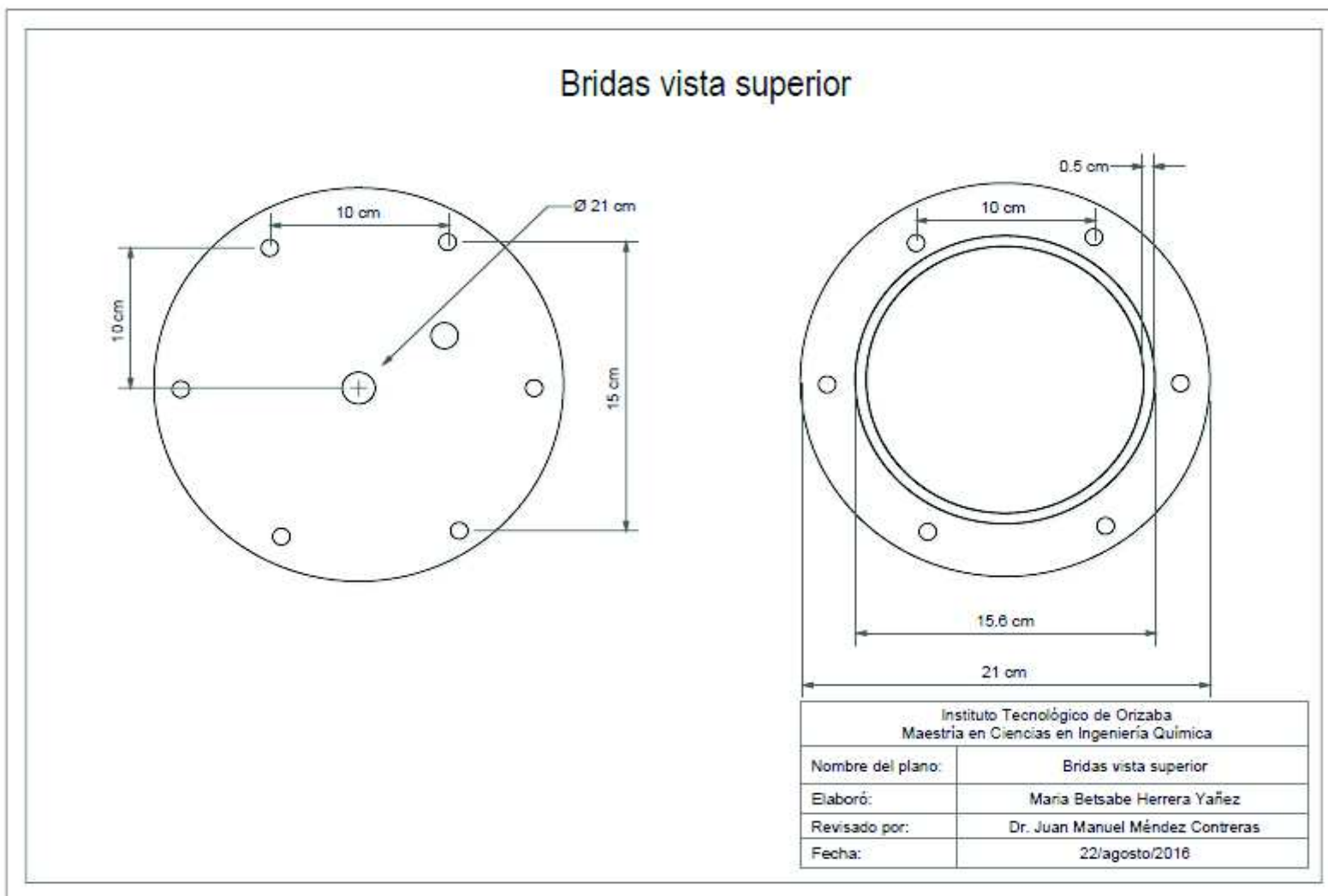


Figura AC. 5 Bridas vista superior

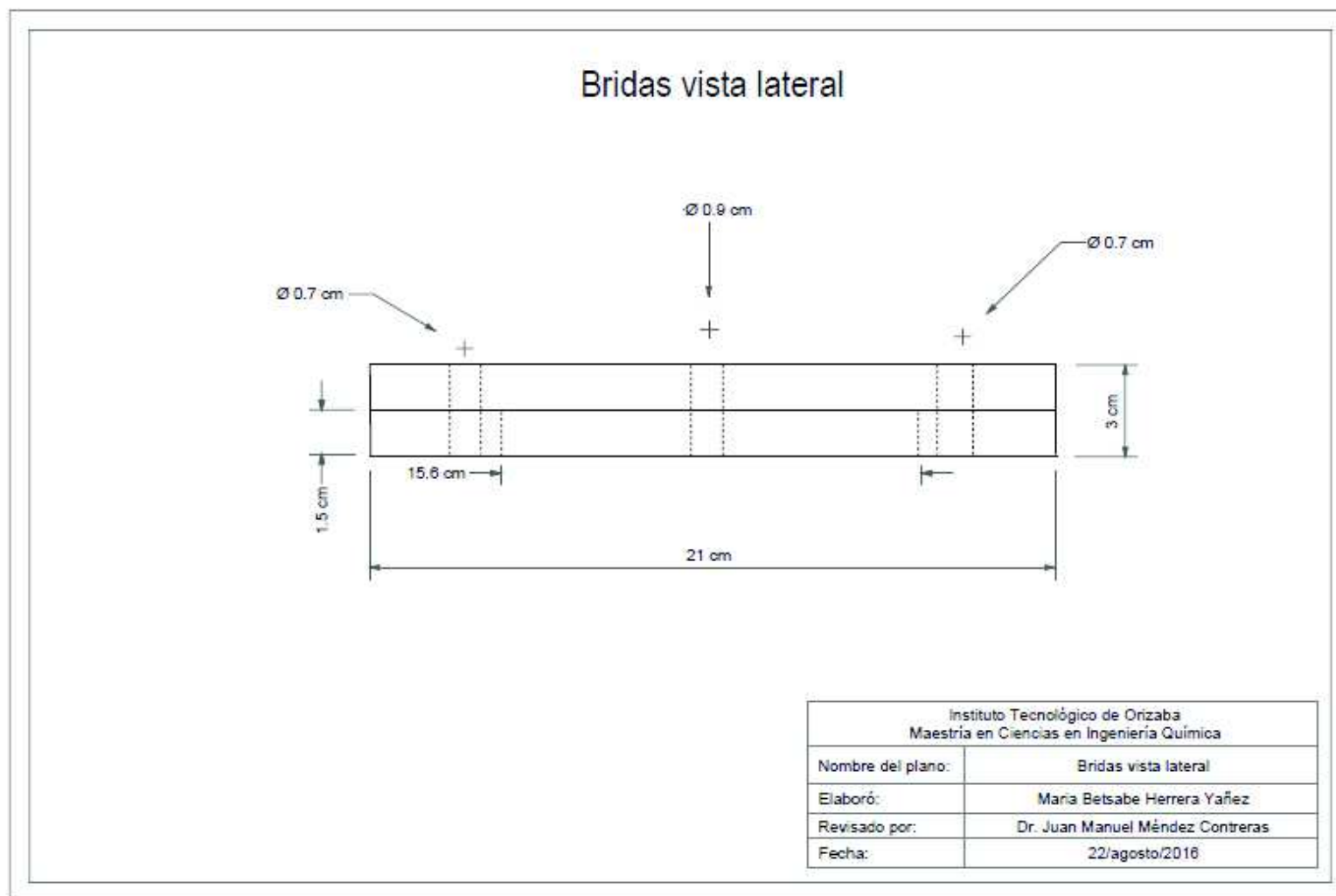


Figura AC. 6 Bridas vista lateral

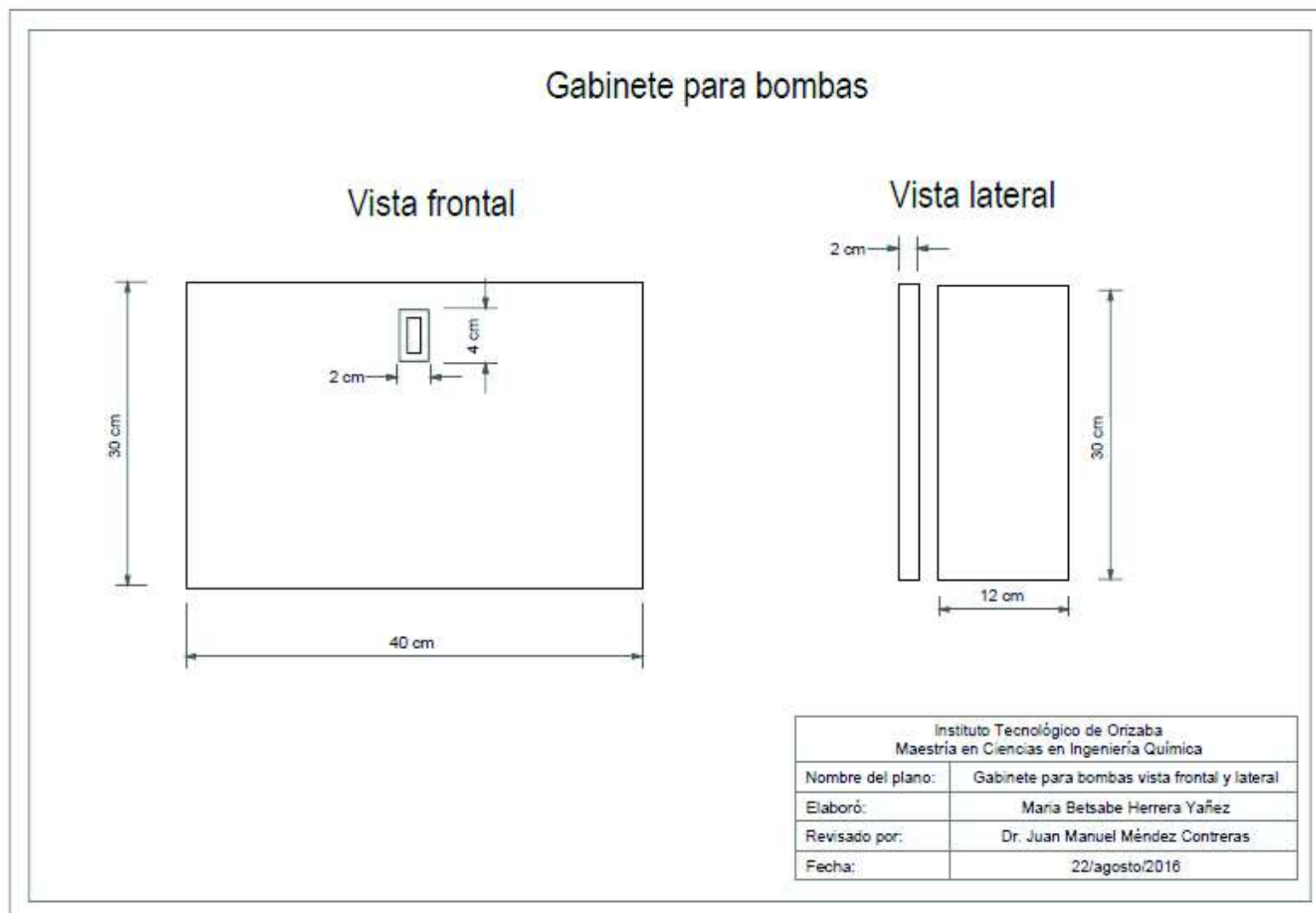


Figura AC. 7 Gabinete de bombas, vista frontal y lateral

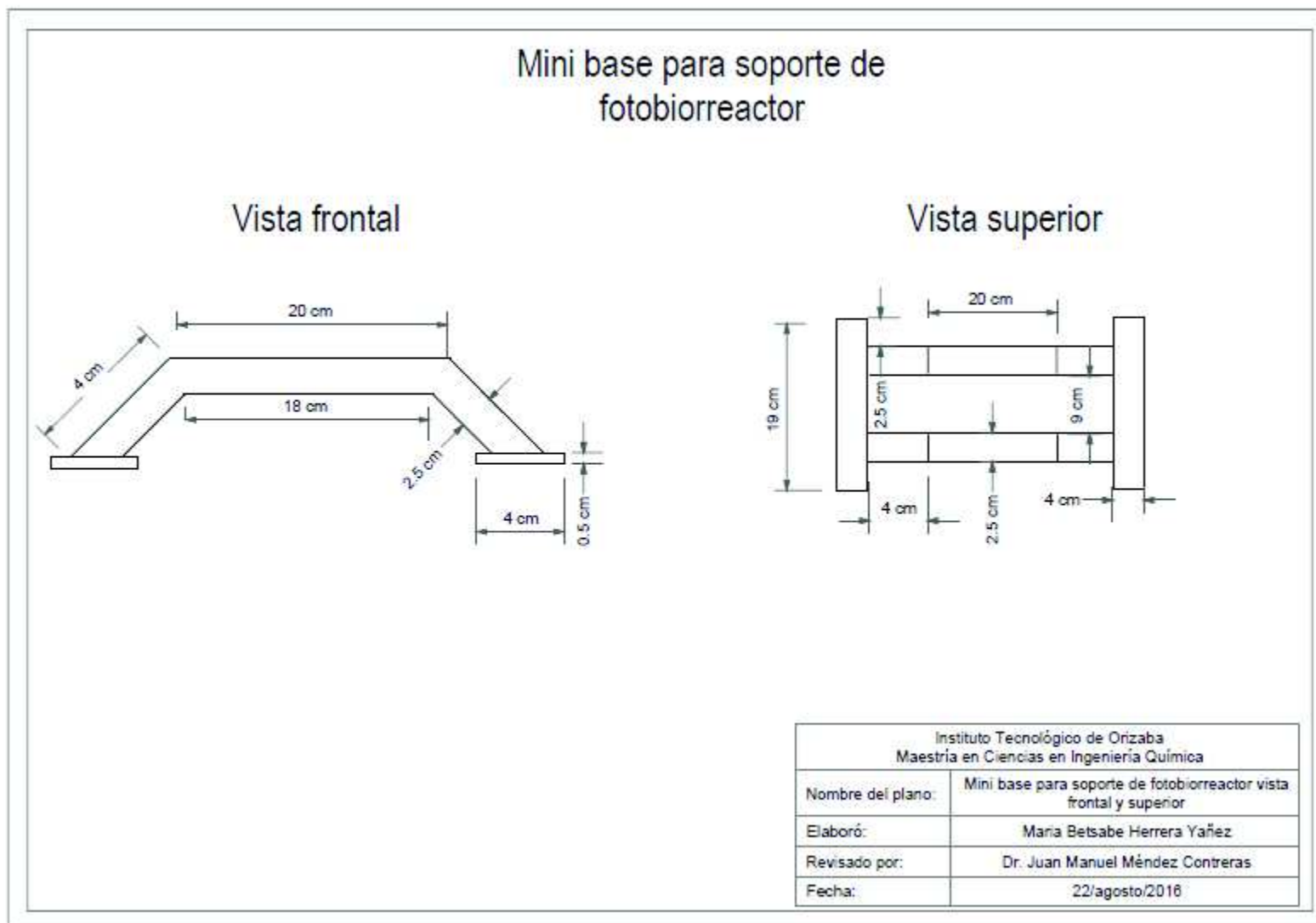


Figura AC. 8 Mini base para soporte de fotobiorreactores



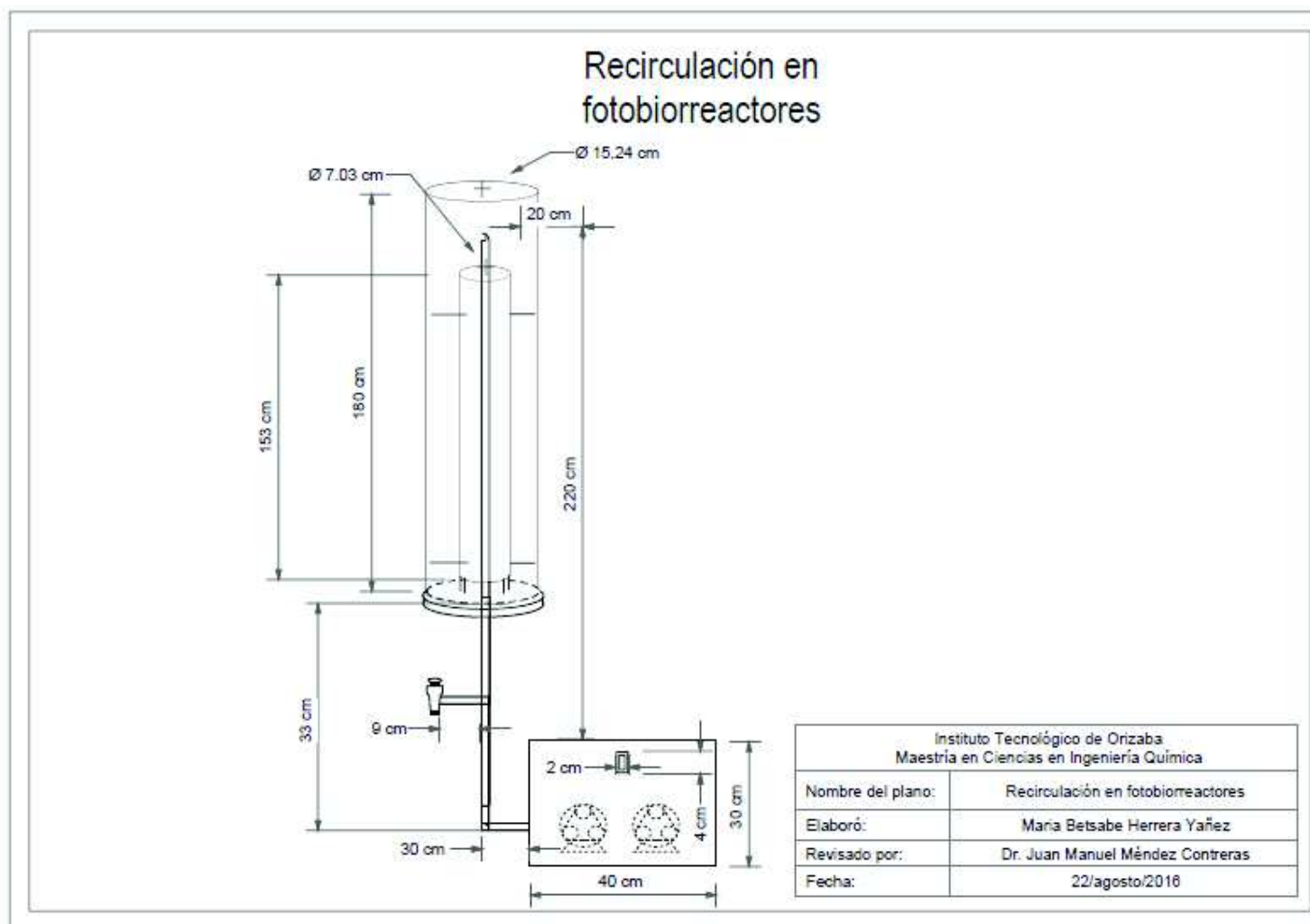


Figura AC. 9 Recirculación en fotobiorreactores

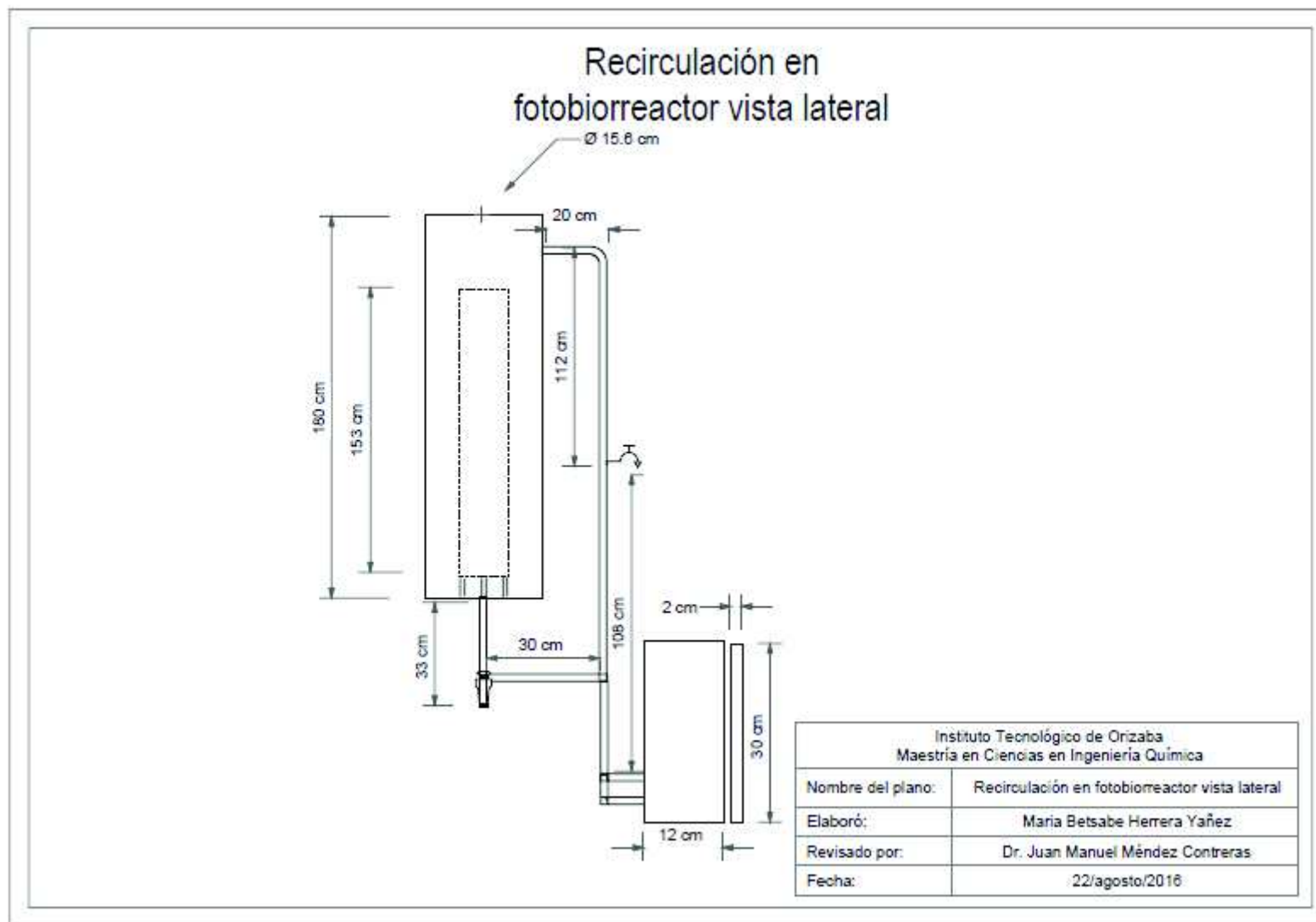


Figura AC. 10 Recirculación en fotobiorreactores vista lateral

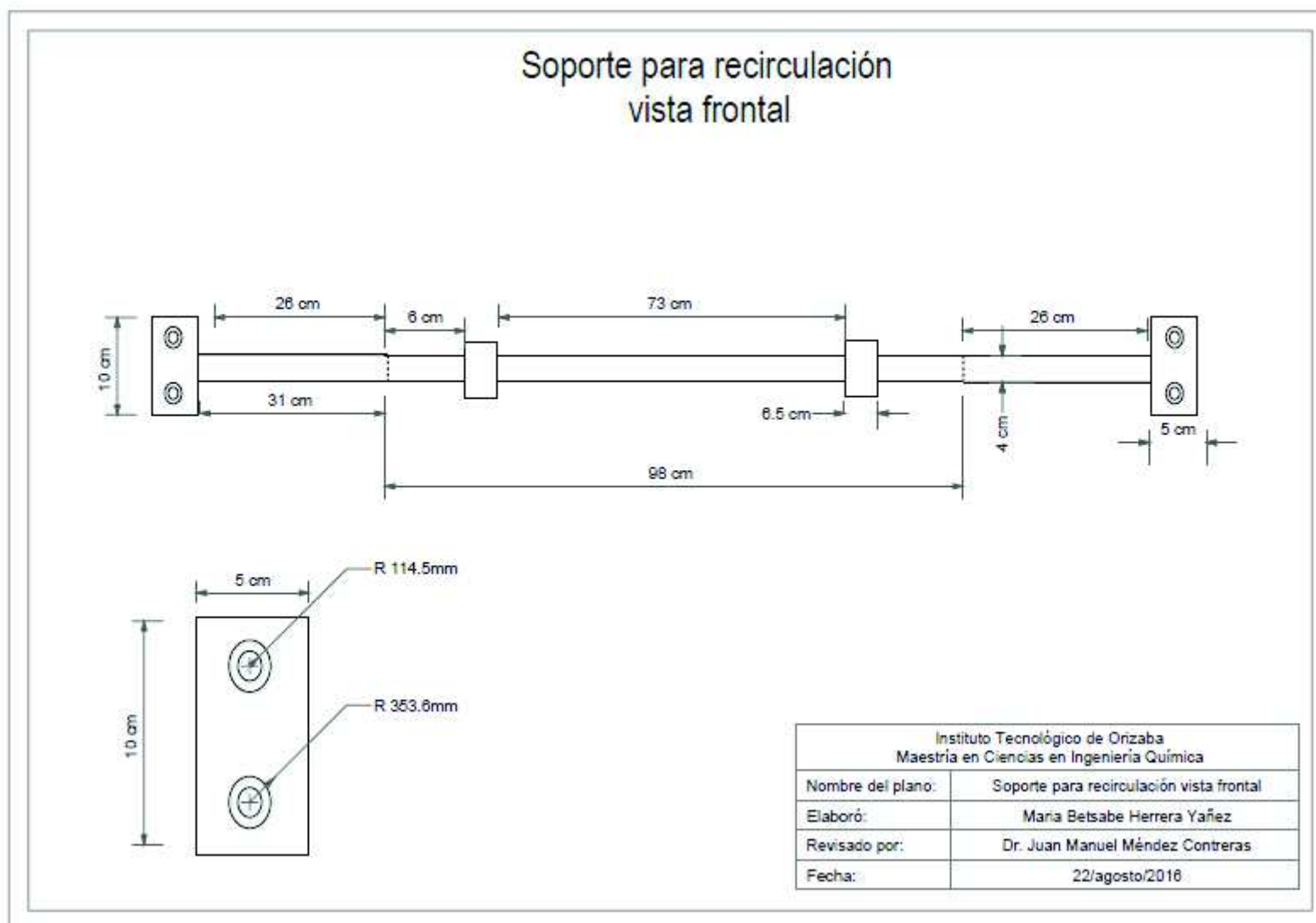


Figura AC. 11 Soporte para recirculación vista frontal

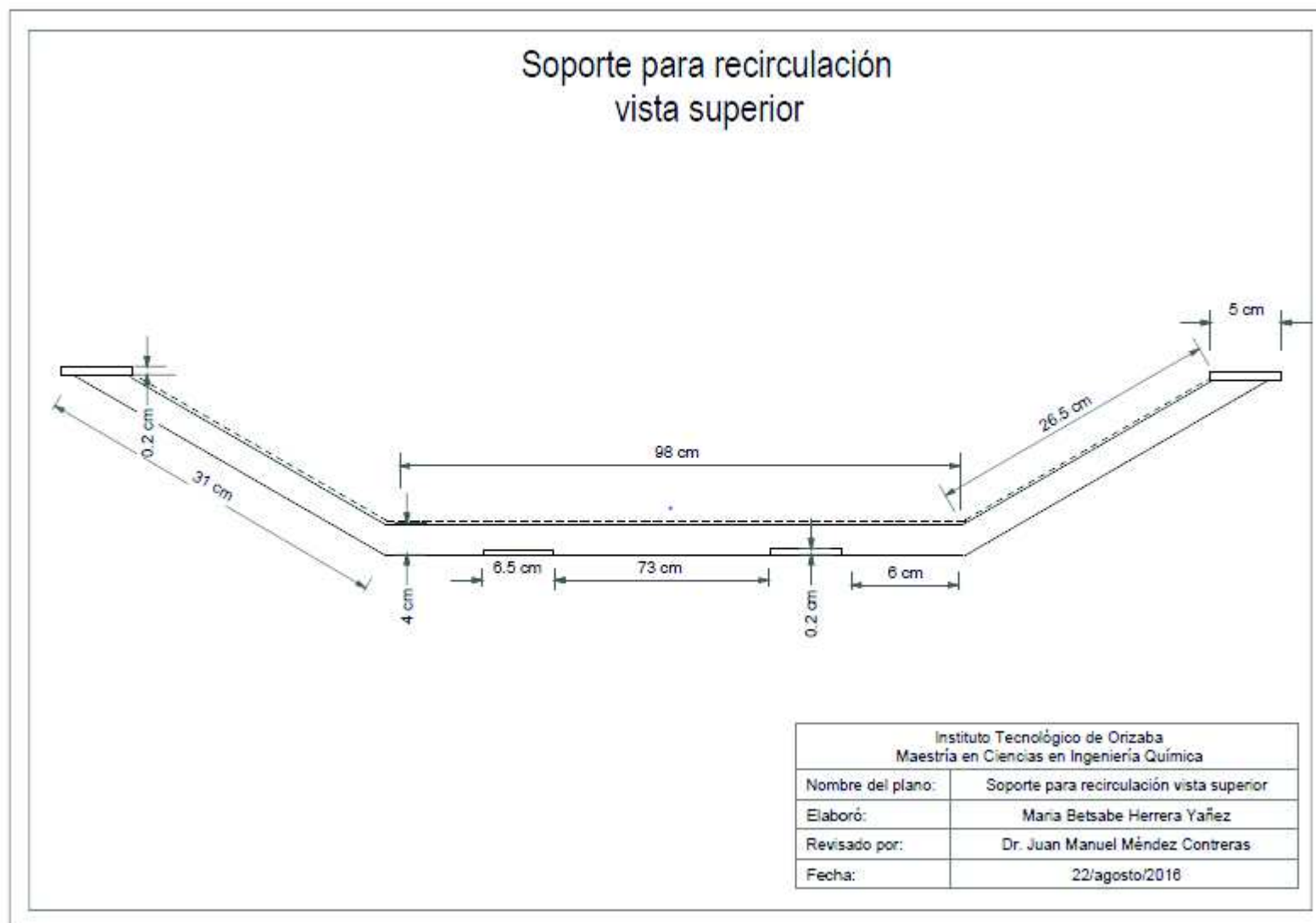


Figura AC. 12 Soporte para recirculación vista superior

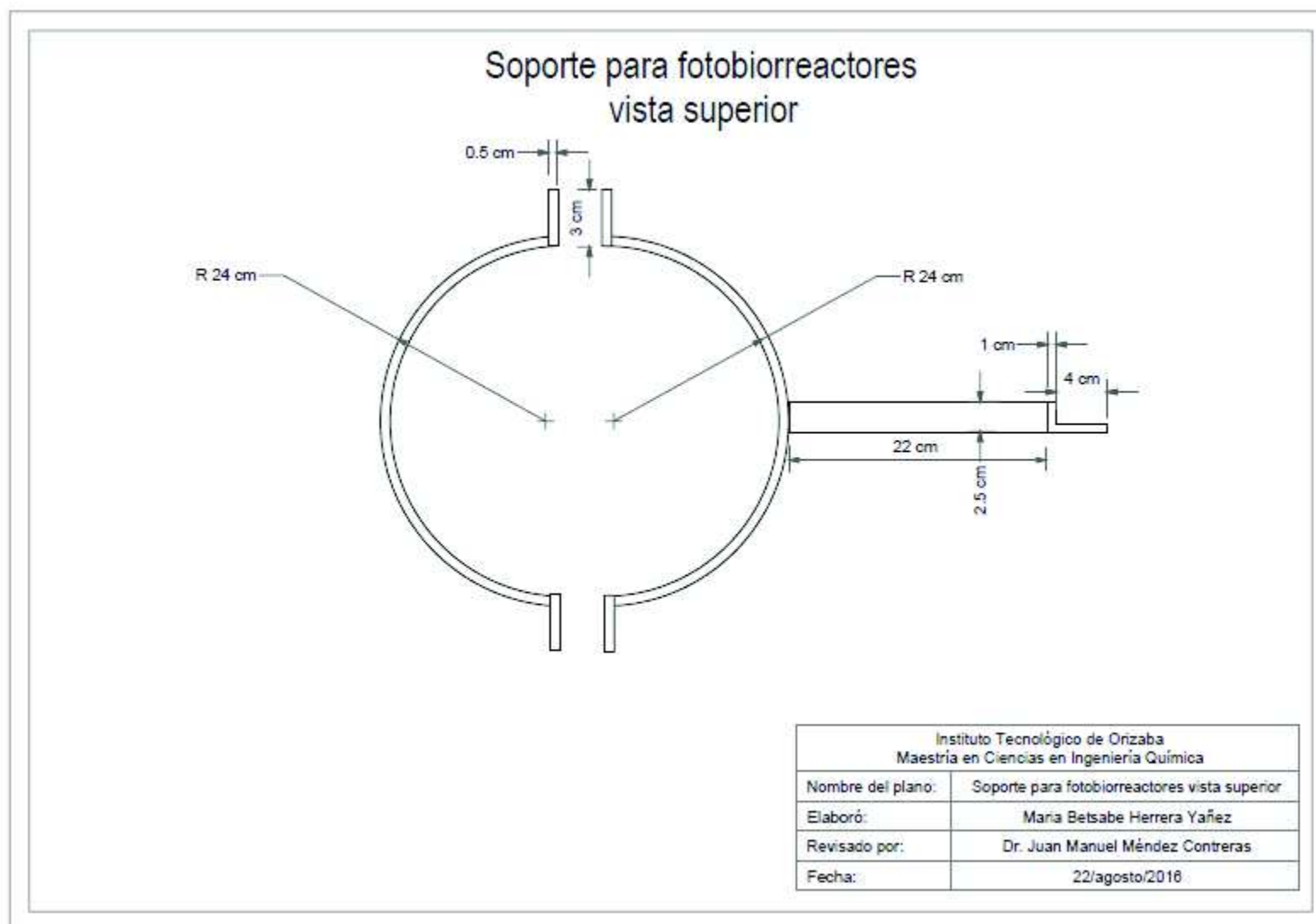


Figura AC. 13 Soporte para fotobiorreactores vista superior

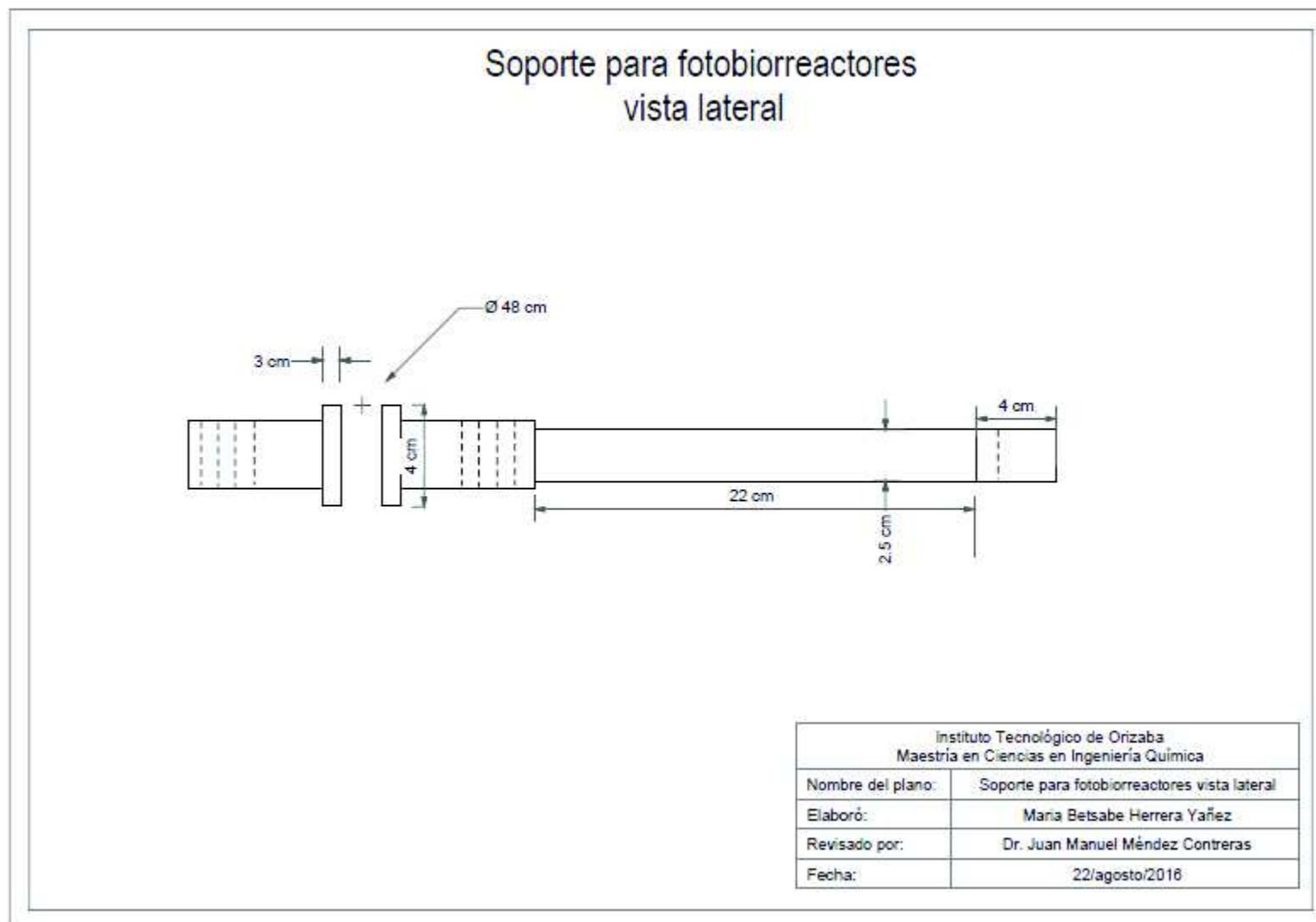
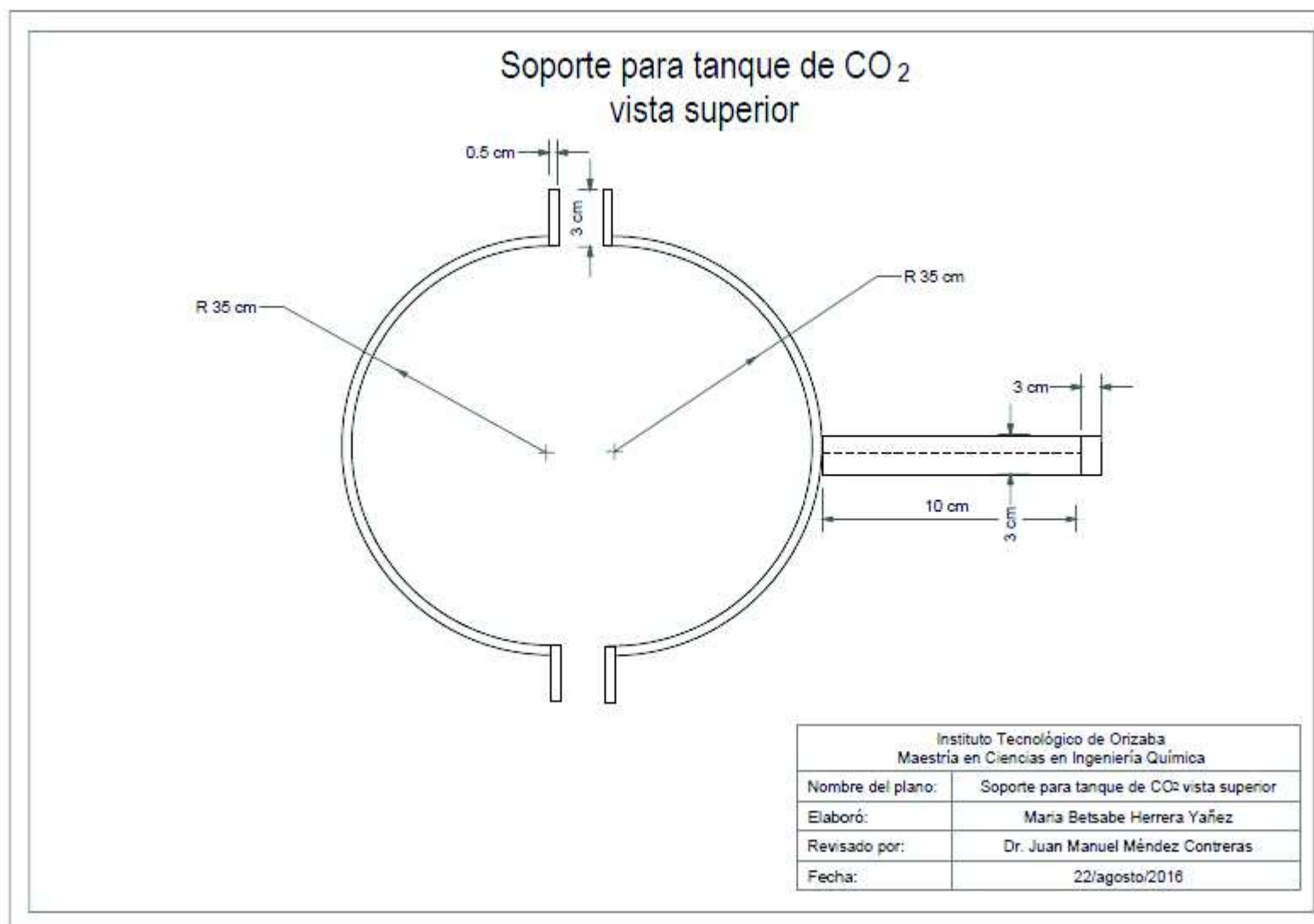
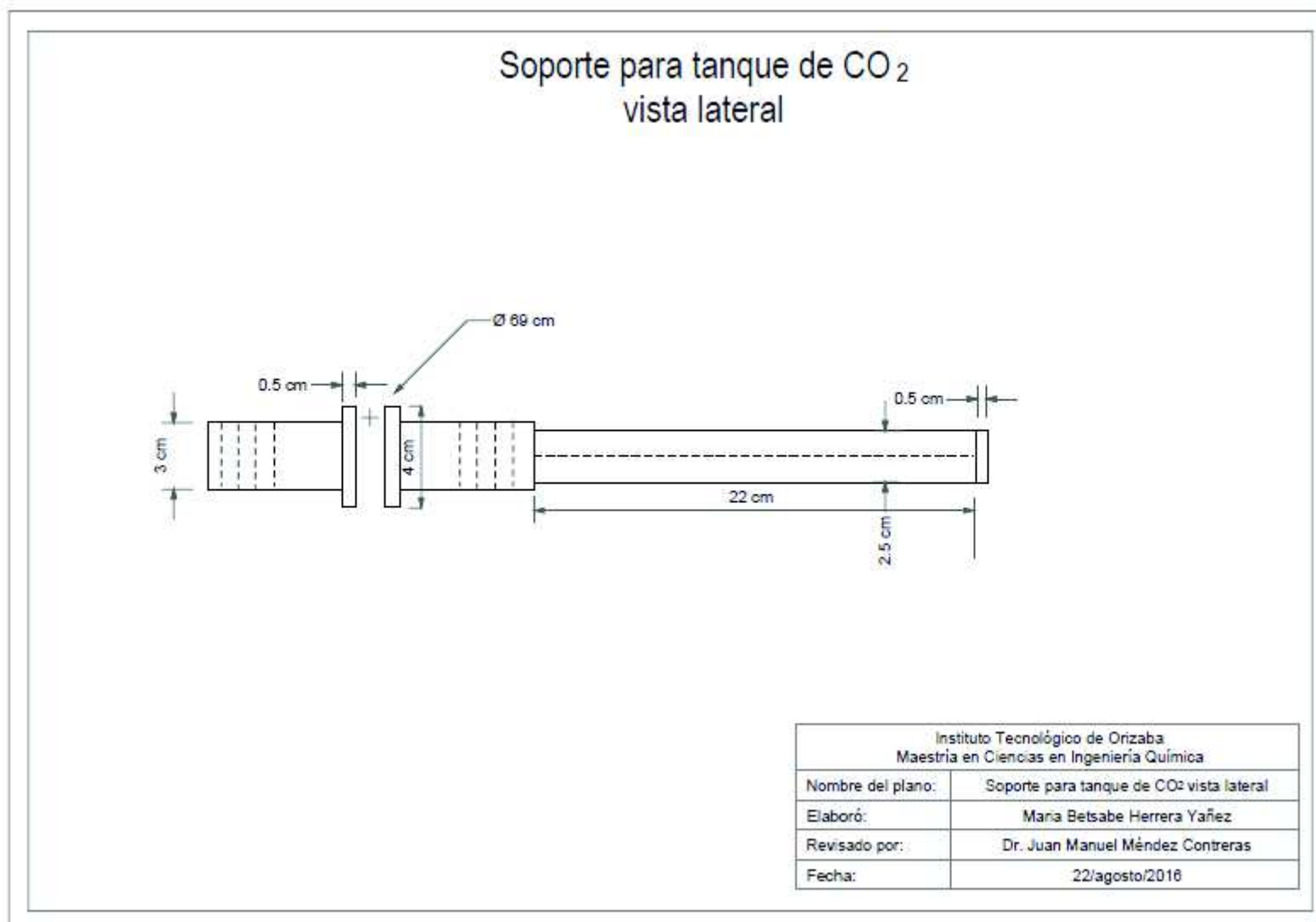
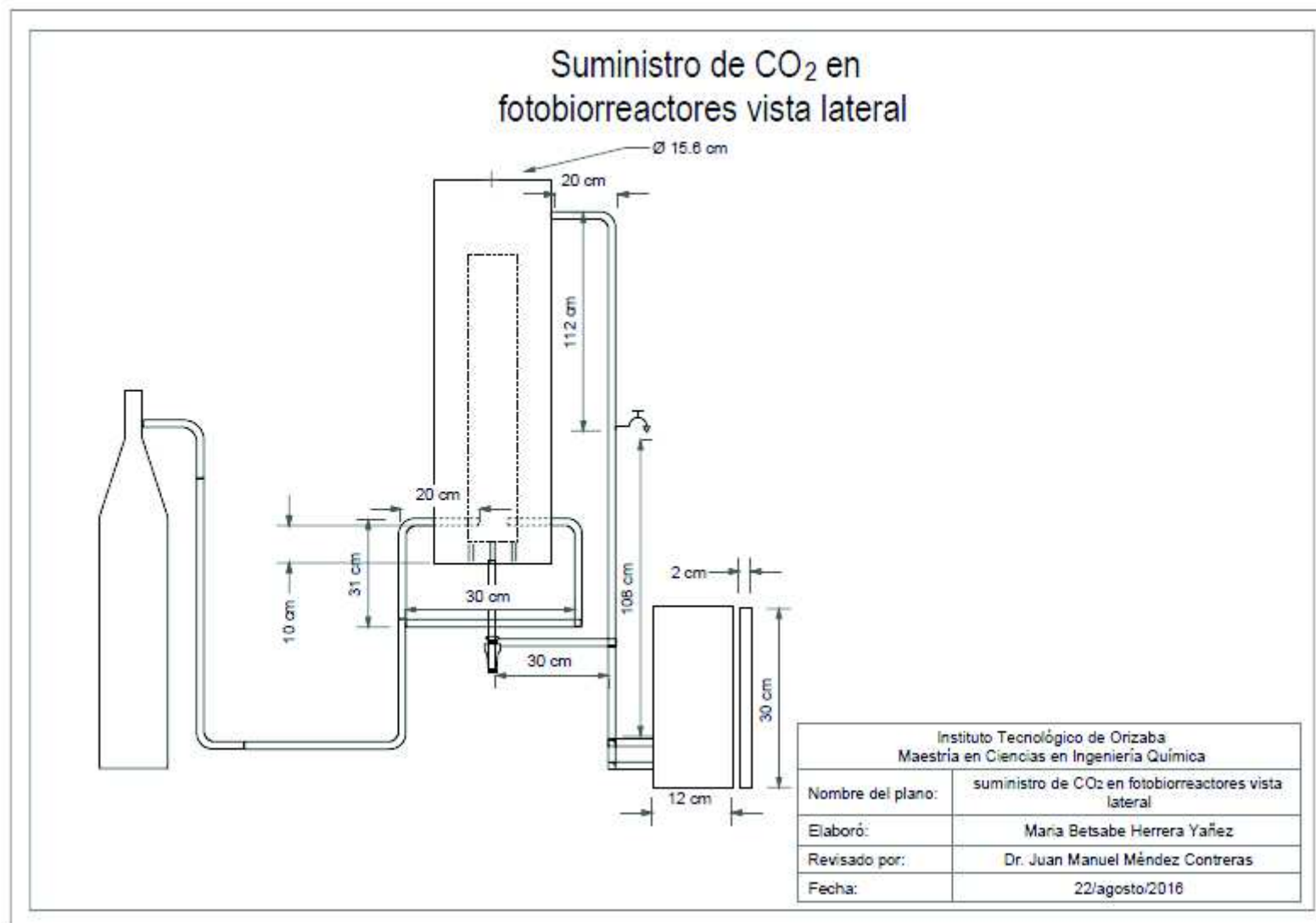


Figura AC. 14 Soporte para fotobiorreactores vista lateral

Figura AC. 15 Soporte para tanque CO<sub>2</sub> vista superior

Figura AC. 16 Soporte para tanque CO<sub>2</sub> vista lateral



Figura AC. 17 Suministro de CO<sub>2</sub> en fotobiorreactores vista lateral

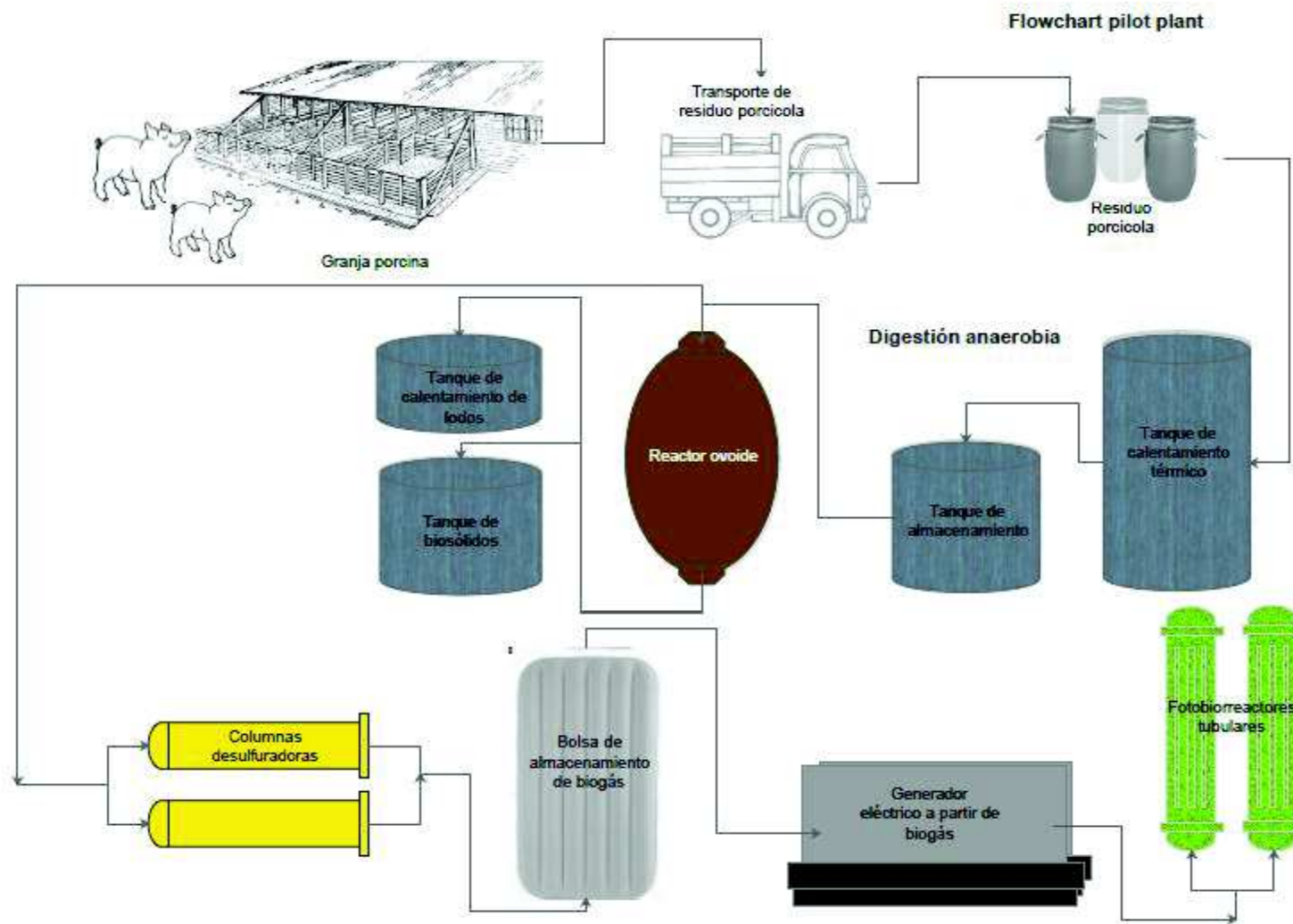


Figura AC. 18 Diagrama de flujo del proceso en planta piloto

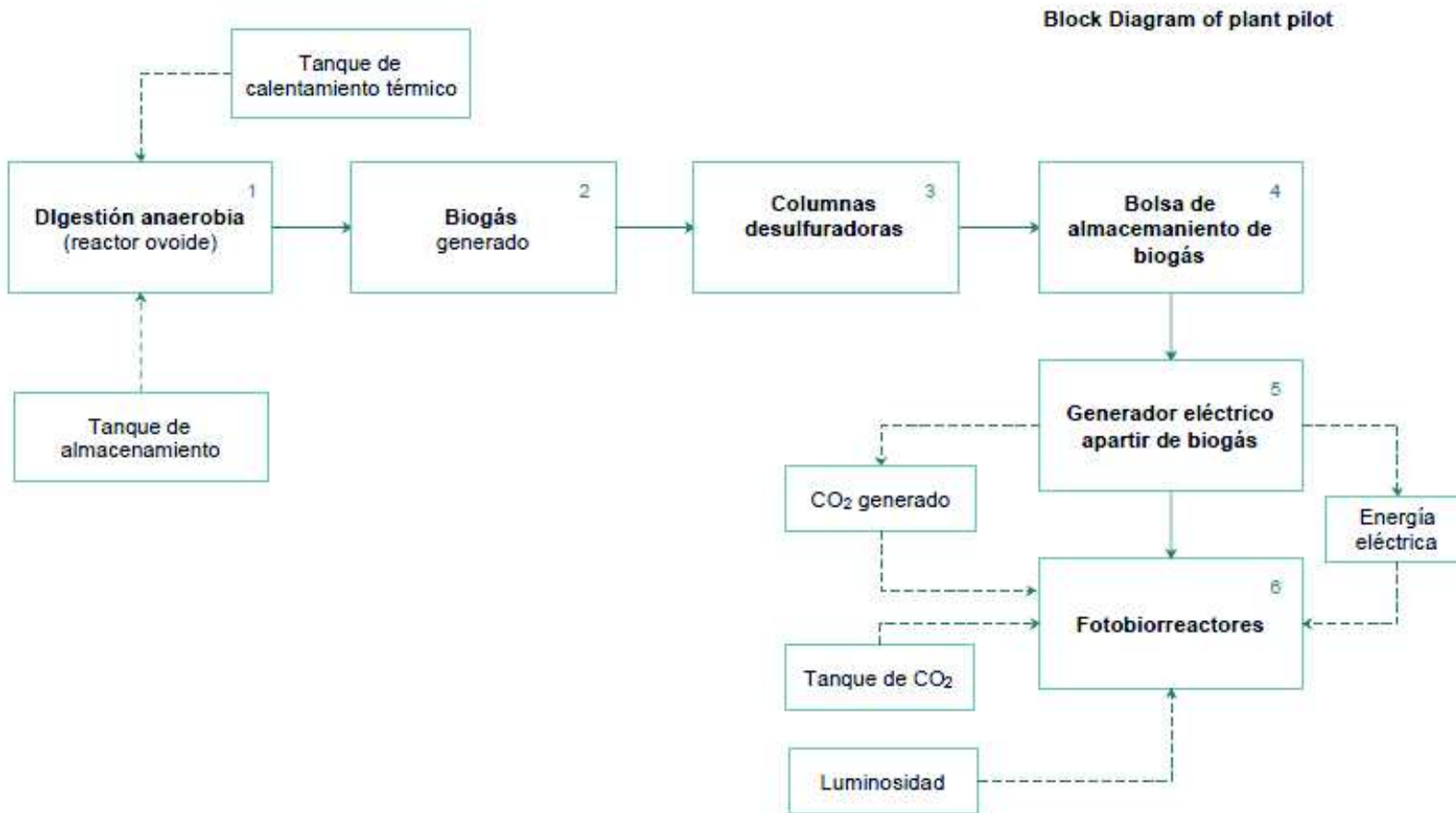


Figura AC. 19 Diagrama de bloques del proceso en planta piloto

Plant pilot Layout

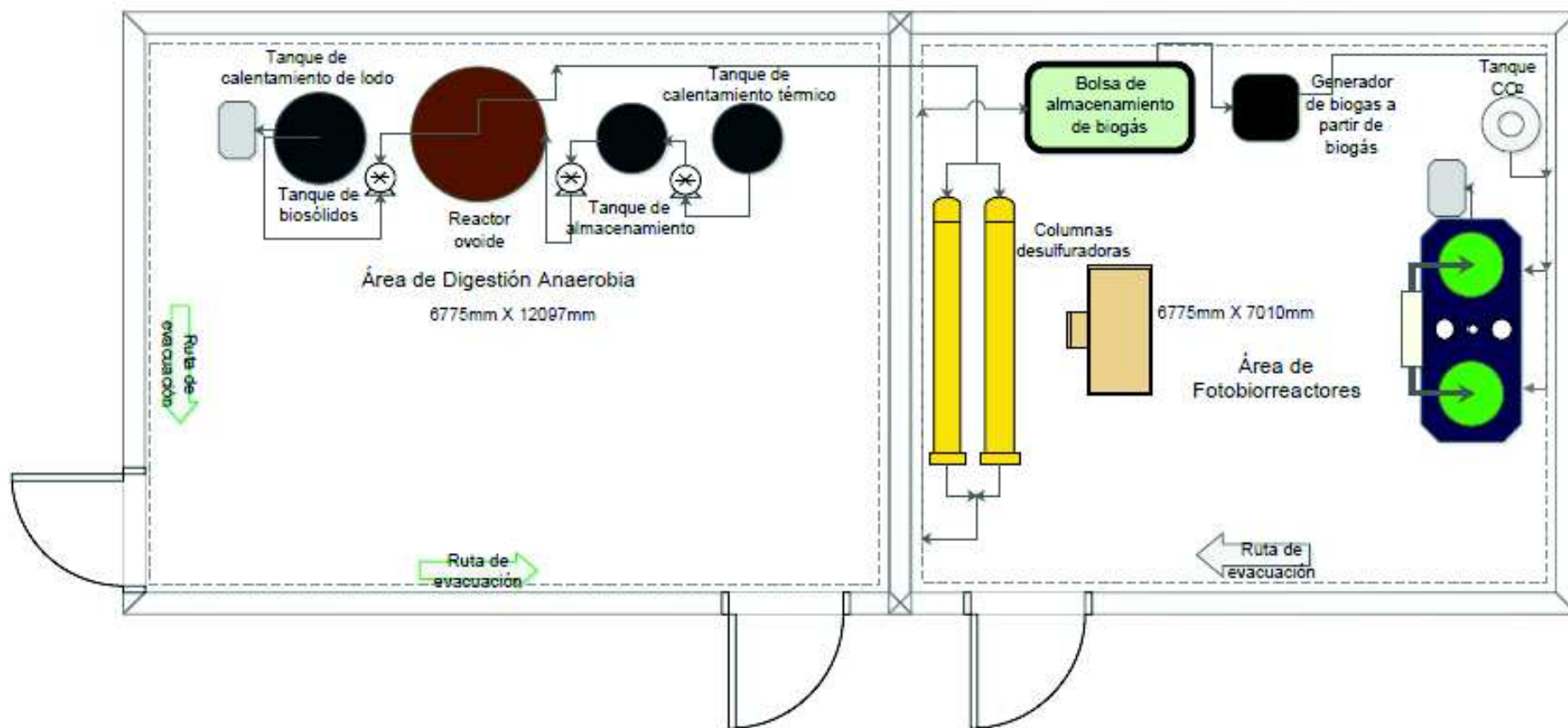
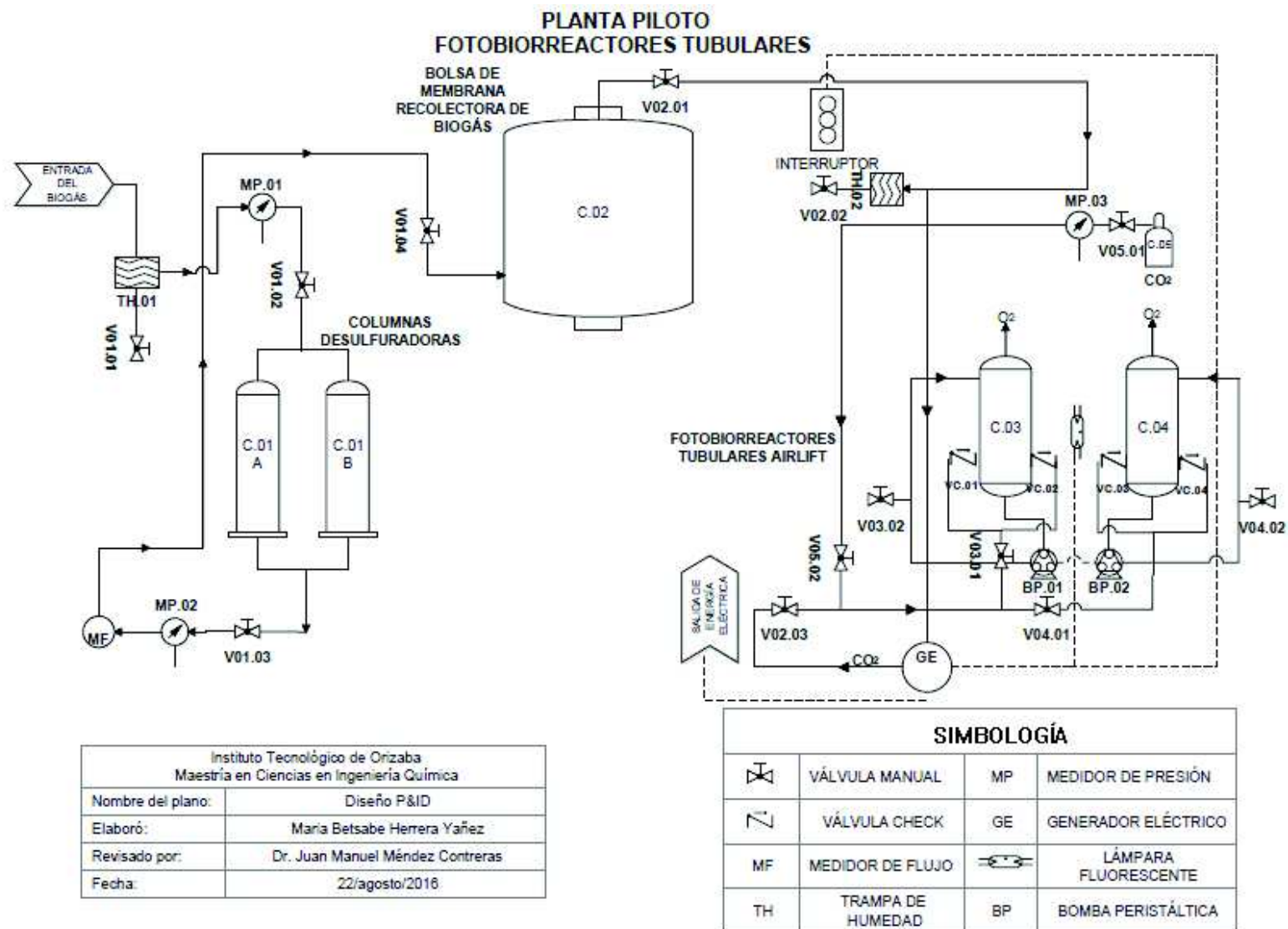


Figura AC. 20 Layout de planta piloto



Instituto Tecnológico de Orizaba Maestría en Ciencias en Ingeniería Química	
Nombre del plano:	Diseño P&ID
Elaboró:	María Betsabe Herrera Yañez
Revisado por:	Dr. Juan Manuel Méndez Contreras
Fecha:	22/agosto/2016

Figura AC. 21 Diseño P&ID



**ANEXO D**

## ANEXO D

### Instrumentación ISA

**ISA** (Instrument Society of America)

**ANSI/ISA-S5.1** (Identificación y símbolos de instrumentación)

Esta norma establece de manera uniforme y estándar los medios de representación, la identificación y funciones propias de los instrumentos o dispositivos, sistemas de instrumentación utilizados para la medición, seguimiento y control, presentando un sistema de designación que incluye sistemas de identificación y símbolos gráficos.

**Diagrama de instrumentación P&ID** (Piping and instrumentation Diagram)

También conocido como diagrama de instrumentación y canalizaciones de la planta, este es un esquema donde se registra toda la instrumentación sobre un diagrama de flujo de proceso.

Los símbolos y nomenclatura que se utilizan en los diagramas de instrumentación están desarrollados en diversos estándares. Una norma muy difundida a nivel mundial son las publicadas por ISA en particular la S5.1. Los sistemas de control de procesos se representan en diagramas de tuberías e instrumentos (P&ID) utilizando símbolos normalizados. Se representan: instrumentación, tuberías, bombas, motores y otros elementos auxiliares. Los instrumentos del lazo de control se representan por un círculo con las letras de designación del instrumento así como el número identificativo del lazo de control al que pertenecen (Norma ISA-S5.1).

#### **Identificación del Instrumento**

En la Figura AD.1 se muestra un ejemplo y el nombre completo de equipo, nombre que no se repetirá en la planta o en el plano para ningún otro equipo.

El código completo del instrumento es: **20-FT-1982 A**

- ✓ **La primera parte (unidad)**, se pueden leer dos dígitos: “20”, representa la unidad a la que pertenece el equipo. En algunos proyectos, en especial cuando son muy grandes, dividen el proyecto en distintas unidades, aunque en otras es poco común.
- ✓ **La segunda parte (tipo de instrumento)**, el código muestra dos letras “FT”, estas letras indican el tipo de instrumento, en el caso de un transmisor de caudal (Flow-meter). Otros ejemplos: analizador (AT), caudalímetro (FT), transmisor de temperatura (TT), transmisor de nivel (LT). Considerando que las letras son de las palabras en inglés, aunque también puede seleccionar u definir las dos letras según el equipo con que se esté trabajando.



Figura AD. 1 Codificación de un instrumento en un P&ID

- ✓ **Tercera parte (número de lazo)**, “1982” cada lazo de control se le da un número consecutivo. El lazo de control es el número de equipos, cuya lógica de control está directamente relacionada.
- ✓ **Cuarta parte (sufijo)**, se puede poner una última letra en el código, para indicar que el equipo es redundante. Se ponen equipos redundantes en lazos críticos, para que en caso de fallo de un equipo, actúe el otro.

### Letras de identificación

La identificación funcional de un instrumento o su equivalente funcional consiste de letras tomadas de la Figura AD.2, que incluye una primera letra la cual es para designar



la edición o variable inicial, y una o más letras sucesivas las cuales designan las funciones ejecutadas.

### Símbolos de líneas de conexión de instrumento a instrumento.

En la Figura AD.3 se muestra los símbolos y flechas que indican la dirección del flujo y los distintos tipos en las que pueden ser utilizados.

Letras de identificación					
	Primera Letra		Letras Sucesivas		
	Variable medida	Modificador	Función de lectura	Función de salida	Modificador
<b>A</b>	Análisis		Alarma		
<b>B</b>	Quemador, combustión		Selección del usuario	usuario	usuario
<b>C</b>	Selección del usuario			Controlador	
<b>D</b>	Selección del usuario	Diferencial			
<b>E</b>	Tensión		Sensor (elemento primario)		
<b>F</b>	Rata de flujo	Relación			
<b>G</b>	Selección del usuario		Dispositivo de vidrio, minilla		
<b>H</b>	Manual				Alto
<b>I</b>	Corriente (eléctrica)		Indicación		
<b>J</b>	Potencia	Muestreo			
<b>K</b>	Tiempo	Rata de tiempo		Estación de control	
<b>L</b>	Nivel		Luz		Bajo
<b>M</b>	Humedad	Momentáneo			Medio, intermedio
<b>N</b>	Selección del usuario		Selección del usuario	Selección del usuario	
<b>O</b>	Selección del usuario		Orificio, restricción		
<b>P</b>	Presión, vacío		Punto de prueba		
<b>Q</b>	Cantidad	Integrador, total			
<b>R</b>	Radiación		Registrador		
<b>S</b>	Velocidad, frecuencia	Safety		Interruptor	
<b>T</b>	Temperatura			Transmisor	
<b>U</b>	Multivariable		Multifunción	Multifunción	Multifunción
<b>V</b>	Vibración, análisis			Válvula, damper	
<b>W</b>	Peso, fuerza		Vaina o pozo térmico		
<b>X</b>	Sin clasificar	Eje X	Sin clasificar	Sin clasificar	Sin clasificar
<b>Y</b>	Evento o estado	Eje Y		Relé, convertidor	
<b>Z</b>	Posición, dimensión	Eje Z		Elemento final	

Figura AD. 2 Letras de identificación para equipos (Norma ISA S5.1, pág. 30)

### Símbolos de instrumentos secundarios

Los instrumentos secundarios son aquellos que son utilizados para medir y tener el control de dispositivos que incluyen hardware y no se limitan a visores de nivel, manómetros, termómetros y reguladores de presión como se observa en la Figura AD. 4.

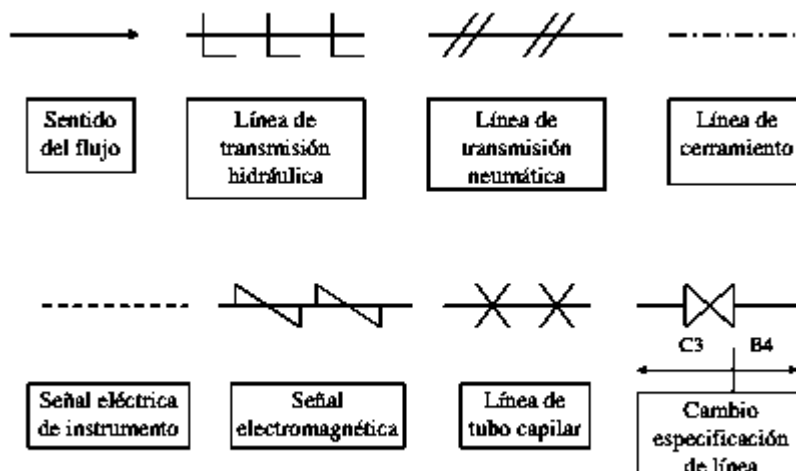


Figura AD. 3 Símbolos de líneas de conexión de instrumento a instrumento

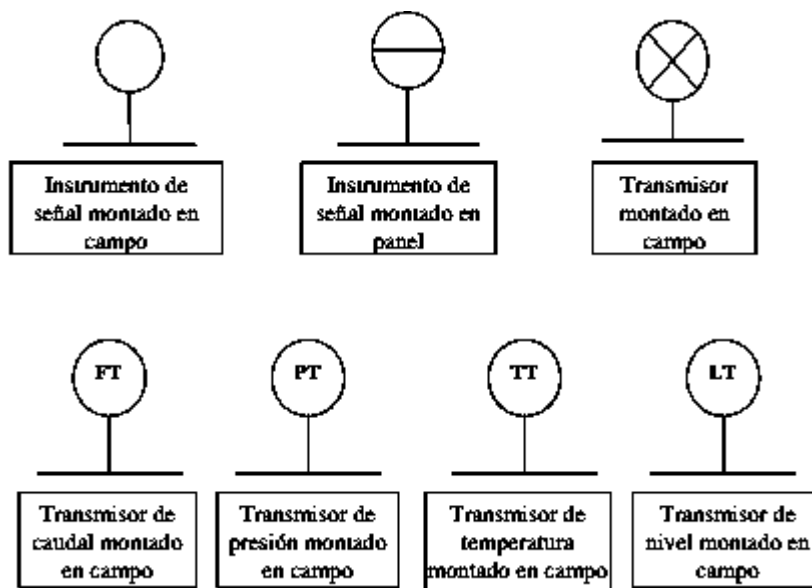


Figura AD. 4 Símbolos de instrumentos secundarios (Norma ISA S5.1)

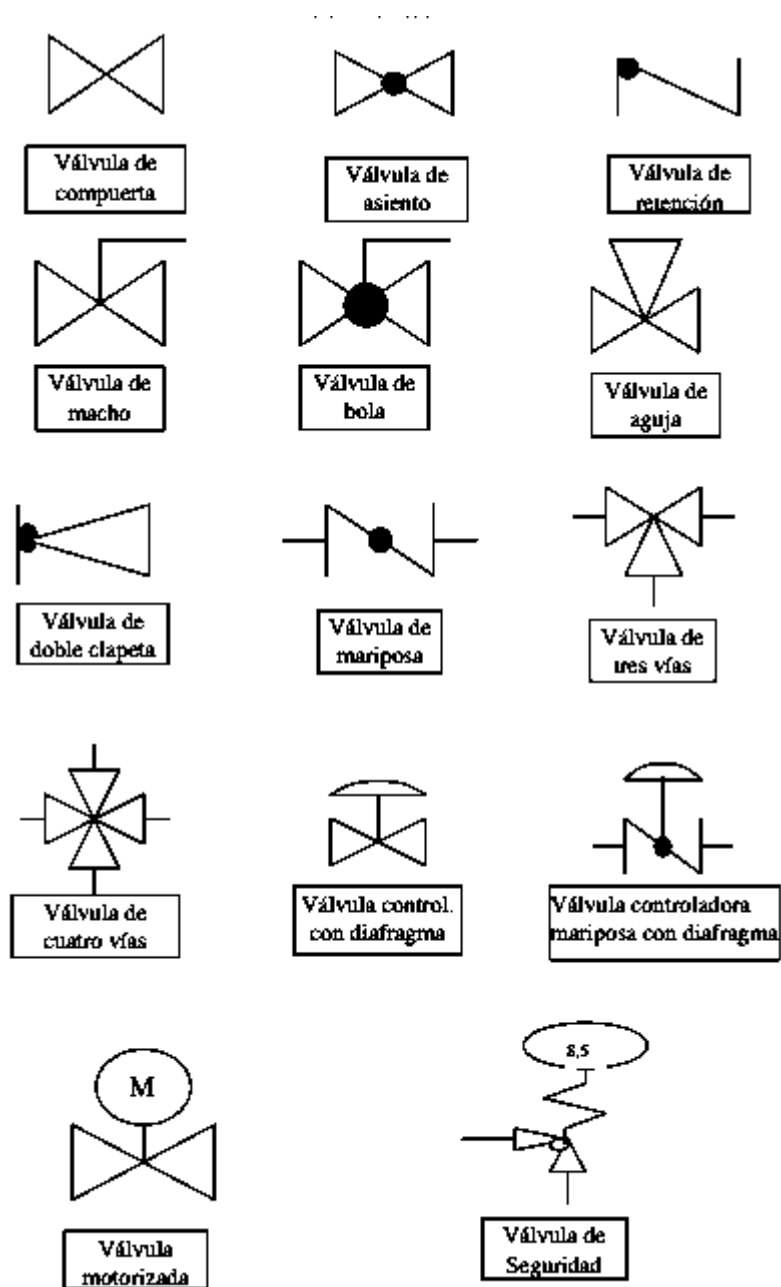


Figura AD. 5 Símbolos de elementos finales de control (Norma ISA S5.1)

## Válvulas

En la Figura AD. 5 se muestran las válvulas de control de procesos y actuadores lo cual estos tienen como objetivo regular el flujo de las líneas de proceso.

### Simbología de equipos del proceso

La unificación de símbolos de instrumentos para todas las áreas de la ingeniería es importante, por tal razón, en la siguiente Figura AD. 6 se muestran los símbolos de equipos que hacen parte de los procesos.

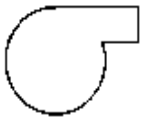
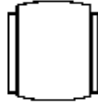
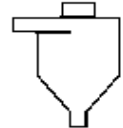



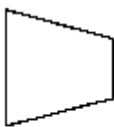
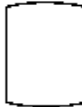

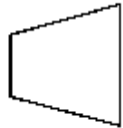


	Ventilador		Tanque enchaquetado		Separador cyclonico
	Bomba		Reactor		Separador rotativo
	Compresor		Tanque (vessel)		Pulverizador
	Turbina		Precipitador electrostático		Torres de destilación

Figura AD. 6 Simbología de equipos del proceso (Norma ISA S5.1)



**ANEXO E**

## ANEXO E

### Cálculo de potencia de la bomba

Cada una de las variables consideradas para el cálculo de la potencia de la bomba que se utilizaron las siguientes:

$\rho$  = Densidad del cultivo (1000.176 kg/m<sup>3</sup>)

$V$  = Velocidad del flujo del fotobiorreactor (5.277 m/s)

$\mu$  = Viscosidad (1.55x10<sup>-5</sup> cp)

$D$  = Diámetro de la tubería (0.022 m)

$\varepsilon/D$  = Rugosidad relativa PVC (0.006)

$Q$  = Caudal (0.01463 m<sup>3</sup>/s)

- Cálculo del Número de Reynolds

Para este cálculo se utilizó la ecuación (E1). Se sustituyeron los datos obteniendo y a su vez compraron en el diagrama de Moody mostrado en la Figura AE.1, obteniendo lo siguiente:

$$NRe = \frac{D \cdot V \cdot \rho}{\mu} \quad (E1)$$

$$NRe = \frac{(1000.176 \cdot 5.277 \cdot 0.022)}{(1.55 \times 10^{-5})} = 7491253$$

Utilizando la rugosidad relativa y el Número de Reynolds se encuentra el coeficiente de fricción en el diagrama de Moody obteniendo lo siguiente:

$$f = 0.033$$

- Cálculo de la longitud equivalente ( $L_{eq}$ )

La longitud equivalente de la tubería está comprendido por la longitud de la tubería lineal y la longitud equivalente de los accesorios que participan en la línea de suministro y recirculación. Este está dado por la siguiente ecuación (E2):

$$L_{eq} = L + L_{eq} \text{ accesorios}$$

La longitud de la tubería es: 3.03 m

Diámetro del tubo: 0.022 m

Para la longitud equivalente de los accesorios se consideran los 4 accesorios presentes en la recirculación teniendo codos de 90° por lo que la longitud equivalente de los accesorios se calcula de la siguiente manera:

$$L_{eq \ 1 \ acc.} = L \cdot D$$

$$L_{eq \ 1 \ acc.} = 3.03 \text{ m} \cdot 0.022 \text{ m} = 0.066 \text{ m/accesorio}$$

Por lo tanto la longitud equivalente de los accesorios es:

$$L_{eq \ 4 \ acc.} = 0.066 \cdot 4 = 0.2666$$

La longitud total es:

$$L_{eq} = 3.03 \text{ m} + 0.2666 = 3.2964 \text{ m}$$

Con estos datos se determinará la pérdida de la carga total ( $h_{f \ total}$ )

$$h_{f \ total} = \frac{(f \cdot L_{eq} \cdot V^2)}{2Dg}$$

$$h_{f \ total} = \frac{(0.033 \cdot 3.2964 \cdot (5.27)^2)}{2(0.022)(9.8)} = \frac{3.0212}{0.4312} = 7.0064 \text{ m}$$

- Cálculo de la carga de trabajo de la bomba

Con los cálculos anteriores se determina la carga de trabajo de la bomba ( $H_B$ ) a partir de la siguiente fórmula:

$$H_B = h_{f_{total}} + \frac{P_2}{\rho \cdot g} + \frac{V^2}{2 \cdot g} + Z_2 - Z_1$$

$$h_{f_{total}} = 7.0064 \text{ m}$$

$$P_2 = 1.6 \times 10^6 \text{ kg} \cdot \text{m}/\text{seg}^2$$

$$\rho = 1000.176 \text{ kg}/\text{m}^3$$

$$g = 9.8 \text{ m}/\text{seg}^2$$

$$V = 5.27 \text{ m}/\text{s}$$

$$Z_2 = 2.5 \text{ m}$$

$$Z_1 = 0.33 \text{ m}$$

$$H_B = 7.0064 \text{ m} + \frac{1.6 \times 10^6 \frac{\text{kg} \cdot \text{m}}{\text{seg}^2}}{1000.176 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \cdot 9.8 \frac{\text{m}}{\text{seg}^2}} + \frac{(5.27 \frac{\text{m}}{\text{s}})^2}{2 \cdot 9.8 \frac{\text{m}}{\text{seg}^2}} + 2.5 \text{ m} - 0.33 \text{ m} =$$

$$H_B = 7.0064 \text{ m} + 163.23 + 1.4169 + 2.17 =$$

$$H_B = 173.8233 \text{ m}$$

- Cálculo de la potencia de la bomba (P)

Para el cálculo de la potencia se utiliza la ecuación siguiente:

$$P = H_B \cdot \rho \cdot g \cdot Q$$

$$P = 173.82 \text{ m} \cdot 1000.176 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \cdot 9.8 \frac{\text{m}}{\text{seg}^2} \cdot 0.01463 \frac{\text{m}^3}{\text{s}}$$



$$P = 24926.12 \frac{kg \cdot m^2}{seg^3}$$

El cálculo de la potencia teórica de la bomba considerando la equivalencia de 1 HP=745 W

$$HP = \frac{24926.12}{745} = 33.46 W$$

La eficiencia de la bomba tiene un 85. Calculando la potencia real de la bomba es:

$$HP_{real} = \frac{33.46}{0.85} = 39.362 W$$

Por lo tanto la potencia teórica del motor de la bomba sería el inmediato superior de 50 W por lo que es necesario un motor más grande y con una potencia mayor.

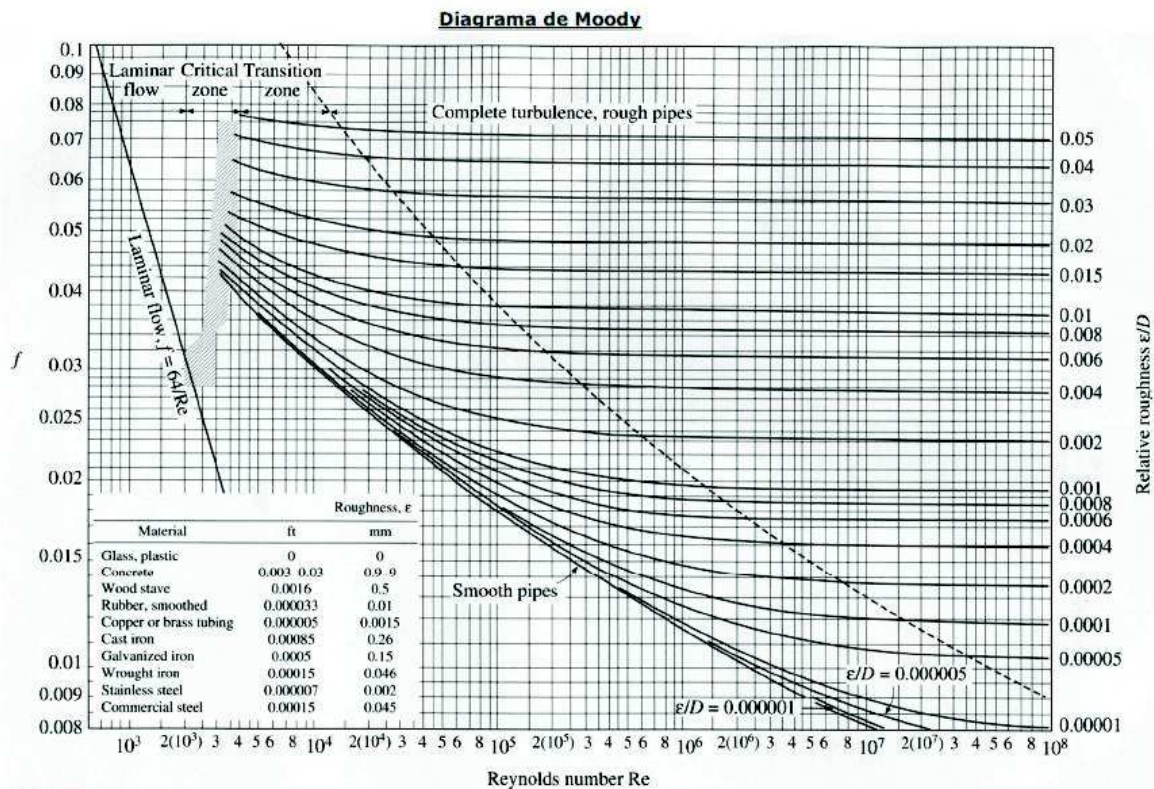


Figura AE. 1 Diagrama de Moody



**ANEXO F**

**ANEXO F**  
**Especificaciones técnicas de los equipos**

Tabla AF. 1 Especificaciones técnicas de los equipos

<b>Equipo</b>	<b>Especificaciones</b>
<p><b>Lámparas</b> <b>Philips</b></p>	<p>Diámetro T8 (26 mm) Base G-13 Potencia 20 W Índice de rendimiento de color: 85 Flujo luminoso: 1 mil 650 lúmenes (20 W) Vida útil promedio: 40 mil horas Voltaje de alimentación de controlador integrado: 120-277 V Modelo 0.430</p>
<p><b>Bombas</b> <b>Peristálticas</b></p>	<p>Dimensiones del cuerpo de la bomba: 35x95x103 Dimensiones del motor: 75x105 Alimentación del motor: 270 V 50 Hz/24 Hz CC Peso 1.5 kg aproximadamente Tubería de 3,2 mm x 2,6 mm Verderprene con conectores de polipropileno Rotor con 4 rodillos Rpm: 127 1.011 L/min 60.47 L/h</p>

siguiente

Continuación Tabla AF.1 Especificaciones técnicas de los equipos

Equipo	Especificaciones
<b>Tubería hidráulica Tuboplus</b>	<p>Tubos y conexiones producidos con polipropileno Copolímero Random (PP-R).</p> <p>Las piezas son unidas por termofusión, proceso que las convierte en una sola pieza (unión molecular).</p> <p>Soporte a temperaturas extremas de agua (-5°, 90° C).</p> <p>Alta resistencia a la presión del agua (24 kg/cm<sup>2</sup> a temperatura ambiente 20° C).</p> <p>Capa protectora externa UV que proporciona protección al tubo contra los rayos ultravioletas.</p> <p>Capa interna antibacterial AB que inhibe la reproducción de bacterias</p>
<b>Tubería pvc 1/2"</b>	<p>La Tubería Hidráulica de PVC Cedula 40 cementar (Schedule 40 Pipe) se fabrica bajo la norma americana ASTM D-1785 y la norma nacional NMX-E-145/1, se fabrica con Resina (materia prima) virgen 12454-b de acuerdo a la norma americana ASTM D-1784, la longitud de esta Tubería Hidráulica de PVC son de 6.0 m en tubería Nacional y 20 pies (6.10m m). La Temperatura máxima que se recomienda es de 140 °F (60 °C), su fabricación es de Color Blanco y esta listada por el NSF-PW Standard 61 &amp; Standard 14, se puede conectar con cualquier conexión de sistema Ingles la más recomendada seria Cedula 40, incluso la conexión de Cedula 80 es compatible para esta tubería.</p>



**ANEXO G**

## ANEXO G

## Especificaciones funcionales de los equipos

Tabla AG. 1 Especificaciones funcionales de los equipos

Equipo	Operación de equipos
<b>Lámparas</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Asegúrese que las lámparas estén energizadas en el tablero. De no ser así, se mueve el switch a ON en la línea correspondiente con el nombre de “lámparas” para encender las mismas.</li> <li>2. Posteriormente se prueban las lámparas que funcionen de manera correcta y se selecciona el switch de acuerdo a las lámparas que se deseen mantener encendidas.</li> <li>3. Al término del periodo de tiempo seleccionado, se mueve el Switch a OFF cuando se desee apagar las lámparas.</li> </ol>
<b>Bombas y tablero</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Abrir el tablero y mover el switch ON correspondiente con el nombre de “bombas” para encender las mismas. Esta mandara una señal al tablero de los fotobiorreactores encendiendo el semáforo de color rojo que indica que está detenida la bomba. Cada bomba pertenece a cada fotobiorreactor, por lo que en el tablero se puede operar según la bomba que se requiere.</li> <li>2. En el tablero existen 4 botones (2 de color verde y 2 de color rojo) que indican que la bomba está detenida (rojo) o encendida (verde) según la bomba correspondiente. Debajo de estos están otros 4 botones, 2 corresponden a la bomba A y 2 que corresponden a la bomba B. Estos servirán para dar funcionamiento a la bomba. Si se desea encenderla se presiona el botón verde. Si se desea detenerla se presiona el botón rojo.</li> <li>3. Al término del periodo de tiempo seleccionado, se mueve el Switch a OFF cuando se desee apagar la bomba.</li> </ol>

Siguiendo

## Continuación Tabla AG.2 Especificaciones funcionales de los equipos

<b>Equipo</b>	<b>Operación de equipos</b>
<b>Tubería y llaves</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Las tuberías de pvc están conectadas del generador eléctrico a los fotobiorreactores y de igual forma del tanque de CO<sub>2</sub> a los fotobiorreactores. Estas tuberías se unen con un conector T, seguido con una llave de bola que servirá para dar paso al CO<sub>2</sub>. Posteriormente cuenta con una válvula check que servirá para evitar el retorno del líquido y dar paso al gas.</li> <li>2. Las llaves de bola permanecerán cerradas, solo se abrirán cuando se abra el Tanque de CO<sub>2</sub> para el suministro o el ingreso del gas proveniente del generador eléctrico.</li> </ol>
<b>Fotobiorreactor airlift</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Para ingresar el cultivo, el fotobiorreactor debe estar completamente limpio y sin ningún residuo. En la parte inferior del fotobiorreactor se encuentra una llave de bola que servirá para desfogar el sistema. Esta debe cerrarse completamente.</li> <li>2. Posterior a esto, en la parte superior se debe quitar todos los tornillos, la brida y el empaque.</li> <li>3. Después se ingresa el medio de cultivo y el inóculo de la microalga que se desea monitorear. Se colocan de nuevo el empaque, la brida y los tornillos de manera que estén bien sellados y se evite que se fugue el gas suministrado.</li> <li>4. Al final se enciende el tablero para dar funcionamiento a las bombas y que se mantenga en recirculación según el tiempo que se desea, lo que beneficiara la homogenización del sistema. Cuando se desee tomar muestra, se debe abrir la llave que está en la recirculación.</li> <li>5. Al término del cultivo, se deberá abrir la llave de bola inferior para desfogar el sistema y limpiar el fotobiorreactor.</li> </ol>



**REFERENCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS**



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, R. (2005). *Algal culturing techniques*. 1 st°. Elsevier academic press (pp.33-55, 323).

Alvear-Alayón, M. R., Castillo-Saldarriaga, C. R. y Henao-Argumedo, D. L. (2011). *Evaluación del pH y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas Dunaliella slina y Chlorella nativa como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel*. Tesis de licenciatura. Universidad de Cartagena. Colombia.

Alvarez, A.G., Sanchez, P., & Bernat, J.X. (2012). *Biofijación de CO<sub>2</sub> mediante el cultivo de algas. Diseño de un prototipo de fotobiorreactor para el cultivo de "Spirulina Plantesis"*. Universidad de Oviedo. Congreso Nacional del Medio Ambiente (CONAMA).

Arrúe-Zúñiga, R. 2013. *Reduction of Carbon Footprint by means of Chlorella sp. cultures in photobioreactors*. Journal of Technological Possibilism. 2(3): 2013

Aznar, I. O., Espinosa, A. R., Massa, A., y Perera, A. A. (2011). *La marea roja en la costa norte de la Península de Yucatán*. Licenciatura en Biología Marina, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias – UADY.

Barsanti, L., and Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Second Edition. Pisa, Italy. CRC press.

Barajas, S. A. F., Godoy, R. C. A., Monroy, D. J. D., Barajas, F. C., Kafarov, V. (2012). *Mejoramiento del secuestro de CO<sub>2</sub> por Chlorella vulgaris UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala laboratorio*. Rev. Ion. 25(2): 39-47.

Benavente-Valdés, J. R., Montañez, J. C., Aguilar, C. N., Méndez-Zavala, A., y Valdivia, B. (2012). *Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores*. Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, 7(4), 1-12.

Becerra, J.O. (2010). *Procesos de captura de CO<sub>2</sub>*. CIEMAT departamento de energía Informe técnico.9

- Becker, E.W., (2004). *Microalgae in human and animal nutrition*. In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 312– 351.
- Benítez, L. P. T., Argumedo, D. H., Alayón, M. A., y Saldarriaga, C. R. C. (2015). *Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas*. Facultad de Ingeniería, vol. 24(39), pp.43-54
- Bionova, (2007). El anabolismo, [versión Electronica] disponible en el enlace web: <http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema17.pdf>
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959). *A rapid method of total lipid extraction and purification*. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- Caballero-García, M. (2013). *Desarrollo del proceso de bioconversión del dióxido de carbono contenido en biogás a oxígeno y biomasa a partir de microalgas*. Instituto Tecnológico de Orizaba: Tesis de Maestría.
- Camacho-Quezada, R. D., Escalera-Castillo, C. P., Campos-Toscuente, V. L., González-Pacheco, M. A., y Vázquez-Cervantes, G. I. (2009). *Cultivo y elaboración de un producto comestible de Chlorella vulgaris*. [www.feriadelasciencias.unam.mx/antecedentes/feria17/](http://www.feriadelasciencias.unam.mx/antecedentes/feria17/) (consultado febrero, 2015)
- CFE, S. d. (2012). *Atlas de almacenamiento geológico de CO<sub>2</sub>. México*. México.
- Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I., y Morales, E. (2004). *Uso de Chlorella sp. y Scenedesmus sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela*. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, 38(2).
- Cheng, L., Zhang, L., Chen, H., and Gao, C. (2006). *Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. Separation and purification technology*, 50(3), 324-329.
- CICC, C. I. (2014). *Estrategia nacional del cambio climático*. México, D.F.: Subsecretaría de Planeación y Política Ambiental.

- CMNUCC. (2012). *Convención Marco de Naciones Unidas sobre Cambio Climático*. México: Quinta comunicación nacional ante CMNUCC.
- Contreras-Flores, C., Pena-Castro, J. M., Flores-Cotera, L. B., and Canizares-Villanueva, R. O. (2003). *Advances in conceptual design of photobioreactors for microalgal culture*. *Interciencia*, 28(8), 450.
- Conde, F. F. C., Fernández, D. R., and Espinosa, É. M. G. (2013). *Análisis comparativo de modelos hidrodinámicos y cinéticos para fotobiorreactores airlift*. *Iteckne*, 10(1), 57-66.
- Cobos, M., y Castro, J. (2010). *Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo*. Universidad Nacional de Colombia, 17-26.
- Cortijo, D. (2013). *Desalcalinización del agua mediante intercambio iónico*. *Ingeniería Industrial*. 31: 221-238.
- Chisti, Y. (2007). *Biodiesel from microalgae*. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
- Chisti, Y., and Moo-Young, M. (2002). Bioreactors. *Encyclopedia of physical science and technology*, 2, 247-271.
- Domínguez-García, S. (2014). *Evaluación del desempeño de Chlorella spp y Spirulina máxima en el proceso de bioconversión de dióxido de carbono contenido en biogás a oxígeno y biomasa*. Instituto Tecnológico de Orizaba, México: Tesis de Maestría
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. *Anal. Chem.*, 28: 350–356.
- Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A. A. and Teixeira, J. A. (2010). *Third generation biofuels from microalgae*. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2(3):1355-1366.

- Durán Serrano, L. E., Barajas Solano, A. F., & González Delgado, Á. D. (2016). *Influencia de la relación carbono/nitrógeno en la producción de proteínas totales en Chlorella Vulgaris UTEX 1803*
- Fernández, B. D., Mota, A., Ferreira, A., Dragone, G., Teixeira, J. A., and Vicente, A. A. (2014). *Characterization of split cylinder airlift photobioreactors for efficient microalgae cultivation*. Chemical Engineering Science, 117, 445-454.
- Fernández Ángel, M. y de Procesos, I. (2013). *Diseño, montaje y caracterización de fotobiorreactores airlift para el cultivo de la microalga Chlorella sorokiniana*. Tesis de licenciatura. Universidad EAFIT, Medellín Colombia.
- Fernández, L., L.C., Montiel, M.J. y Millan, O.P. (2012). *Producción de Biocombustibles a partir de Microalgas*. Ra Ximhai 101-115. ISSN: 1665-0441.
- García-Cubero, R. (2014) *Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO<sub>2</sub>*. Tesis de doctorado. Universidad de Sevilla. España.
- Garibay-Hernández, A., Vazquez-Duhalt, R., Sanchez-Saavedra, M., Serrano Carreón, L., and Martínez Jiménez, A. (2009). *Biodiesel a partir de microalgas*. BioTecnología, 13(3), 38-61.
- González-Falfán, K. (2015). *Efecto de las condiciones ambientales en el contenido de pigmentos en la microalga Chlorella spp*. Instituto Tecnológico de Orizaba. México: Tesis de Maestría.
- González, J. (1987). *Las algas de México*. Ciencias, (010).
- Gong, Q., Feng, Y., Kang, L., Luo, M., and Yang, J. (2014). *Effects of Light and pH on Cell Density of Chlorella Vulgaris*. Energy Procedia, 61, 2012-2015.
- Guevara López, Eliane (2008). *Diseño, construcción y caracterización hidrodinámica de un biorreactor multifuncional*. Tesis de licenciatura. Universidad tecnológica de la mixteca. Oaxaca, Huiloapan de León.

Hernández-Pérez, A., and Labbé, J. I. (2014). *Microalgas, cultivo y beneficios*. Revista de biología marina y oceanografía, 49(2), 157-173.

Infante, C., Ángulo, E., Zárate, A., Flores, J., Barrios, F. y Zapata, Z. (2012). *Propagación de la microalga Chlorella sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular*. Avances en Ciencias e Ingeniería. 3(2): 159-164.

INECC, I. n. (2015). *Cambio climático global*. Recuperado el 30 de octubre de 2015, de Semarnat: <http://iecc.inecc.gob.mx/>

ISA Standards Library for Measurement and Control. Version 99-01

Jacob-Lopes, E., Gimenes-Scoparo, C. H., Queiroz, M. I. and Teixeira-Franco, T. (2010). *Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors*. *Energy Conversion and Management* 51(5): 894–900.

James, B., and Ollis David, F. (1986). *Biochemical engineering fundamentals*. Mc Graw Hill Book Company.

Jiménez, M. A. L., y Rojas, M. G. (2011). *Contribución al estudio de la hidrodinámica y transferencia simultánea de masa en biorreactores airlift de tres fases: producción de un consorcio microbiano degradador de petróleo*. Tesis Doctoral. Iztapalapa, México

Kao, C. Y., Chiu, S. Y., Huang, T. T., Dai, L., Wang, G. H., Tseng, C. P. and Lin, C. S. (2012). *A mutant strain of microalga Chlorella sp. for the carbon dioxide capture from biogas*. *Biomass and bioenergy*, 36, 132-140.

Liao, Q., Li Lin, Chen, R. and Zhu Xun, (2014) "A novel photobioreactor generating the light/dark cycle to improve microalgae cultivation", *Bioresource Technology*, Vol. 161, p. 186-191.

Li-Hai F., Ya-Tao Z., Lin Z. and Huan-Lin C.(2008), *Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by Chlorella vulgaris*, *Journal of Membrane Science*, 325, p. 336-345.

Marchetti, J., Bougaran, G., Jauffrais, T., Lefebvre, S., Rouxel, C., Saint-Jean, B., Lukomska, E. Robert, R. and Cadoret, J. P. (2013). *Effects of blue light on the biochemical composition and photosynthetic activity of Isochrysis sp. (T-iso)*. Journal of applied phycology, 25(1): 109-119.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall. K. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem*, 193(1): 265-275.

Morales López, Elisa. (2009). *Cultivos celulares de Jacaratia mexicana en tres tipos de biorreactores para la producción de enzimas proteolíticas*. Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional.

Morris H., Ramírez A., Martín M., Borges L. y Olivares G (2004). Tecnología Química Vol. XXIV, No.1. pp. 73-78.

Muñoz, C. B., Segovia, S. S., y Peris, P. M. (2011). *Estado del arte de las técnicas de captura y almacenamiento de CO<sub>2</sub>*. Aplicación a la industria del cemento. Cemento Hormigón, (941), 54-61.

Muñoz-Peñuela, M., Ramírez-Merlano, J. A., Otero-Paternina, A. M., Medina-Robles, V. M., Cruz-Casallas, P. E., and Velasco-Santamaría, Y. M. (2012). *Effect of culture medium on growth and protein content of Chlorella vulgaris*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 25(3): 438-449.

Norma Mexicana NMX-AA-012-SCFI-2001. Análisis de agua - Determinación de oxígeno disuelto en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. México.

Nilsen, J. and Orcutt, T. (1996). *Physiology of plants under stress: Abiotic factors Physicochemical and environmental plant physiology*. Academic press. ISO 690.

- Ortega, J., Moronta, R. y Morales, E. (2004). *Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga Chlorella sp.* La Universidad del Zulia, Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences, 12(1), 25-31.
- Oscanoa Huaynate, A. I., Huamán, Y., Gheraldine, A., Chang Ávila, I. L., y Aguilar Samanamud, C. P. (2015). *Impacto del CO<sub>2</sub> sobre la densidad celular en seis cepas de microalgas marinas.* Revista Ion, 28(2), 23-32.
- Ovalle, A. P. D., y Manrique, R. R. (2011). *Empleo de las microalgas en la fijación del CO<sub>2</sub> presente en los gases de chimenea de equipos industriales de combustión en Colombia.* ITECKNE, 8(1), 23-30.
- Plasencia, A. J. (2012). *Cultivo de microalgas (Chlorella sorokiniana) con iluminación mediante LEDs.* Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica de Madrid. España.
- Plata, V., Kafarov, V., Moreno, N. (2009). *Desarrollo de una metodología de transesterificación de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas.* Prospect. 7(2): 35-41.
- Praveenkumar, R., Shameera, K., Mahalakshmi, G., Akbarsha, M. A., and Thajuddin, N. (2012). *Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga Chlorella sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production.* Biomass and Bioenergy, 37, 60-66.
- Quevedo, C., Morales, V. y Acosta, C. (2008). *Crecimiento de Scenedesmus sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal.* Revista de la facultad de química farmacéutica. 15(1):25-31.
- Quintero Rangel e Iván Sebastián (2014). *Diseño de una metodología de microalgas para la obtención de carbohidratos, proteínas, lípidos y clorofilas a partir de cultivos mixotróficos de Chlorella vulgaris UTEX 1803.* Tesis licenciatura. Universidad Nacional de Santander, Bucaramanga.

- Ramírez Mérida, L. G., Zepka, L. Q., y Jacob-Lopes, E. (2013). *Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias*. Ciencia y Tecnología (1390-4051), 6(2).
- Radmer, R., Behrens, P., and Arnett, K. (1987). *Analysis of the productivity of a continuous algal culture system*. *Biotechnology and bioengineering*, 29(4), 488-492.
- Rendón-Castrillón, L. J., Ramírez-Carmona, M. E., y Vélez-Salazar, Y. (2015). *Microalgas para la industria alimenticia*. Universidad Pontificia Bolivariana. Colombia.
- Revista Agroenfoque. (2012). Biocombustibles de segunda generación a partir de microalgas. *Agroenfoque* 182: 55-56.
- Rodríguez Cuesta, A. R., y Triana Serrano, F. C. (2006). *Evaluación del pH en el cultivo de spirulina spp. (Arthrospira) bajo condiciones de laboratorio*. Tesis licenciatura.
- Romo-Piñera, A. K. (2002). *Manual para el cultivo de algas*. Universidad Autónoma de Baja California Sur: Memoria técnica de un trabajo profesional.
- Robles, JM. (2003). *Evaluación de un proceso de producción de microalgas para el uso en acuicultura*. Extraído el 6 diciembre del 2015 del sitio web de la Universidad de Almería: <http://repositorio.ual.es.8082/jspui/handle/10835/463>
- Robles-Heredia, J. C., Sacramento-Rivero, J. C., Ruiz-Marín, A., Baz-Rodríguez, S., Canedo-López, Y., y Narváez-García, A. (2016). *Evaluación de crecimiento celular, remoción de nitrógeno y producción de lípidos por Chlorella vulgaris a diferentes condiciones de aireación en dos tipos de fotobiorreactores anulares*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2), 361-377.
- Rosales-Loaiza, N., Guevara, M., Lodeiros, C., y Morales, E. (2008). *Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina Synechococcus sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia*. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 421-429.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd. U. K.



Salamanca, E. J. P., Peñaranda, M. L. P., y Álvarez, N. O. (2005). *Algas como indicadores de contaminación*. Universidad del Valle.

Semarnat. (2013). *Inventario nacional de emisiones de gases de efecto invernadero*. Recuperado el 30 de octubre de 2015, de <http://iecc.inecc.gob.mx/inventario-nacional-emisiones.php>

Shabnam S., R. G. (2015). *Development of photobioreactors for improvement of algal biomass production*. International Journal of scientific Reserch, ISSN 2277-8179.

Shen-Yi, C., Chien-Ya, K., Tzu-Ting, H., Chia-Jung, L., Seow-Chin, O., Chun-Da, C., Jo-Shu, C. and Chih-Sheng, L. (2011). *Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using Chlorella sp. cultures*. Bioresource Technology. 102:9135-9142.

Sousa, M. L. M. D. (2013). Estudo e desenvolvimento de bioreactores de floculação.

Sumardiono, S., Budiyono, syachuirrozi and Budi S., (2014); *Utilization of Biogas as Carbon Dioxide Provider for Spirulina platensis Culture*. Department of Chemical Engineering, University of Diponegoro, Semarang, Indonesia. Current Research Journal of Biological Sciences 6(1): 53-59

Tang H, Abunasser N, García Med, Chen M, Simon KY, Steven KG, *et al. Potential of microalgae oil from Dunaliella tertiolecta as a feedstock for biodiesel*. Appl Energy. (2011); 88(10):3324-3330.

Vargas, D., Giraldo, L., y Moreno-Piraján, J. (2014). *Adsorción de dióxido de carbono a diferentes presiones sobre carbones activados obtenidos por activación química*. Afinidad, 71(566).

Villalobos-Zapata, G. J., y Mendoza Vega, J. (2010). *La Biodiversidad en Campeche: Estudio de Estado*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Gobierno del Estado de Campeche, Universidad Autónoma de Campeche, El Colegio de la Frontera Sur. México.

Zhao, P., Yu, X., Li, J., Tang, X., and Huang, Z. (2014). *Enhancing lipid productivity by co-cultivation of Chlorella sp. U4341 and Monoraphidium sp. FXY-10*. Journal of bioscience and bioengineering, 118(1), 72-77.

Zhang, Q., Zhan, J. J., and Hong, Y. (2015). *The effects of temperature on the growth, lipid accumulation and nutrient removal characteristics of Chlorella sp. HQ*. Desalination and Water Treatment, 1-6.