

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ORIZABA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

Doctorado en Ciencias de la Ingeniería

Título:

“Desarrollo de estrategias de operación de fotobiorreactores
para la producción de pigmentos y nutrientes a partir de
microalgas”

Nombre:

M.C.I.Q. Margarita Caballero García

Asesor:

Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

Co-Asesor:

Dr. Guillermo Cortés Robles

Junio de 2019



"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

FECHA : 03/06/2019

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. DR. RUBEN POSADA GOMEZ
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. :

MARGARITA CABALLERO GARCIA

la cual lleva el título de:

"DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE OPERACION DE FOTOBIORREACTORES PARA LA PRODUCCION DE PIGMENTOS Y NUTRIENTES A PARTIR DE MICROALGAS".

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : DR. JUAN MANUEL MENDEZ CONTRERAS
SECRETARIO : DR. GUILLERMO CORTES ROBLES
PRIMER VOCAL : DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN
SEGUNDO VOCAL : DR. ALBERTO ALFONSO AGUILAR LASSERRE
TERCER VOCAL : DRA. GUADALUPE LUNA SOLANO
VOCAL SUP. : DR. LUIS ANTONIO LOPEZ ESCOBAR

FIRMA
FIRMA
FIRMA
FIRMA
FIRMA
FIRMA

EGRESADO(A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

OPCION: I Tesis



AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Dr. Juan Manuel Méndez Contreras por darme nuevamente la confianza de colaborar en su equipo de investigación, por todo el apoyo y orientación en la realización de este trabajo de tesis. Siempre le estaré agradecida por sus consejos y motivaciones para seguir adelante.

A mi coasesor Dr. Guillermo Cortés Robles por su interés, dedicación y valiosa contribución al presente proyecto, por ser una persona dispuesta a ayudar y demostrar gran profesionalismo. Gracias por su apoyo y orientación.

A los integrantes de mi jurado doctoral:

Dr. Alejandro Alvarado Lassman

Dr. Alberto Alfonso Aguilar Lasserre

Dra. Guadalupe Luna Solano

Dr. Luis Antonio López Escobar

Gracias por su tiempo y por las valiosas aportaciones y recomendaciones para la culminación del presente trabajo.

Al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba por permitirme desarrollar el presente trabajo de tesis, así como a la División de Estudios de Posgrado e Investigación por su accesibilidad y apoyo en los trámites realizados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con el número de registro 252617 que me permitió realizar y culminar mi estudio de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería en la ciudad de Orizaba, Veracruz.

DEDICATORIAS

A Dios

Por el regalo que cada mañana me da al despertar, por darme salud, fortalecer mi corazón e iluminar mi mente en cada etapa de mi vida y lograr esta meta, por su infinita bondad y amor porque sin Él nada es posible.

A mi mami

María Elena García Reyes por haberme apoyado e inspirado en todo momento para salir adelante dándome ejemplos dignos de superación y entrega, por sus valores, por su sacrificio y más que nada por su amor. Todo lo que soy te lo debo a ti. TE AMO!

A mis hermanitas

Eréndira y Maribel Caballero García por estar conmigo y apoyarme siempre, por sus consejos y cariño que me han ayudado a salir adelante, las admiro y las quiero con todo mi corazón.

A mis amigas

Gracias Maricruz, Pau, Rita, Mimi, Betza, Lili, Ana, Are, por ser tan buenas amigas y excelentes personas, he aprendido mucho de ustedes no sólo en lo profesional sino en lo personal. Las quiero mucho!

A mi hermana del alma Glo, ¿qué puedo decirte que tus oídos no hayan escuchado? No me canso de agradecer tu presencia en mi vida, gracias por tu amistad, por las sabias palabras de aliento que han aliviado mis tristezas, por el ánimo que inyectas a mi vida y por todas las muestras de cariño incondicional que me das... Te quiero mil!

Y por supuesto a mis amigos del doctorado Óscar, Kelvyn, Eru, Ramiro, Rodrigo, Roberto Chucho, Armín, Andrés por compartir conocimientos y hacer agradable y amena la convivencia.

RESUMEN

DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE OPERACIÓN DE FOTOBIORREACTORES PARA LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS Y NUTRIENTES A PARTIR DE MICROALGAS

Elaborada por: M.C.I.Q. Margarita Caballero García

Dirigida por: Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

Co dirigida por: Dr. Guillermo Cortés Robles

El objetivo de este estudio fue desarrollar las estrategias de operación de fotobiorreactores, estableciendo las condiciones recomendables en las cuales se obtiene la máxima producción de pigmentos y nutrientes a partir de microalgas (*Chlorella spp.* y *Spirulina máxima*). La caracterización de ambas especies de microalgas muestra que son ricas en macronutrientes como carbohidratos, lípidos y proteínas, así como alto contenido de pigmentos como clorofilas tipo a y b. Se establecieron las dosis recomendables para el óptimo crecimiento de *Chlorella spp.* con 1.5 mL/L de medio Bold Basal y para *Spirulina máxima* de 150% de medio Utex. Las mejores condiciones a escala laboratorio para la absorción de CO₂ fueron 4000 lux de intensidad luminosa y suministro al 2% v/v de CO₂ utilizando la microalga *Chlorella spp.* Estas condiciones fueron implementadas a escala piloto en un fotobiorreactor airlift (26 L) durante 60 días con un suministro 2% v/v de CO₂ proveniente de un generador eléctrico acoplado a un proceso de digestión anaerobia de lodos fisicoquímicos. El máximo %CO₂ consumido fue de 91.92 alcanzado durante el séptimo ciclo de suministro, la producción de biomasa obtenida fue de 2.18 g/L.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que los fotobiorreactores tipo airlift son los complementos adecuados para las tecnologías de digestión anaerobia de lodos fisicoquímicos a fin de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero producidos durante la combustión de biogás.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF OPERATING STRATEGIES OF PHOTOBIOREACTORS TO PRODUCTION OF PIGMENTS AND NUTRIENTS FROM MICROALGAE

Elaborated by: M.C.I.Q. Margarita Caballero García

Advisor: Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

Co advisor: Dr. Guillermo Cortés Robles

The aim of this study was to develop photobioreactor operation strategies, establishing the recommended conditions in which maximum production of pigments and nutrients are obtained from microalgae (*Chlorella spp.* and *Spirulina maxima*). The characterization of both microalgae species shows that they are rich in macronutrients such as carbohydrates, lipids and proteins, as well as a high content of pigments such as chlorophylls type a and b. The recommended doses to optimal growth of *Chlorella spp.* is 1.5 mL / L of Bold Basal medium and 150% of UTEX medium to *Spirulina maxima*.

The best conditions at a laboratory scale were performed in an airlift photobioreactor (FBR) at pilot-scale plant (26 L) during 60 days with a CO₂ supply of 2% v/v from an electric generator coupled to an anaerobic digestion of physicochemical sludge process. The maximum %CO₂ consumed was 91.92 which was reached in the seventh supply cycle and biomass production was 2.18 g/L.

The results obtained showed that airlift type photobioreactors are a suitable complement for anaerobic digestion of physicochemical sludge technologies in order to reduce emissions of greenhouse gases produced during the combustion of biogas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	3
JUSTIFICACIÓN	4
HIPÓTESIS.....	4
CÁPITULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	8
1.1 Antecedentes.....	8
1.2 Contexto nacional de las emisiones de CO ₂	8
1.3 Digestión anaerobia y la producción de CO ₂	10
1.4 Tecnologías de captura y almacenamiento de CO ₂	10
1.5 Las algas.....	12
1.6 Clasificación de las algas.....	13
1.6.1 Algas verdes.....	13
1.6.2 Diatomeas.....	14
1.6.3 Dinoflagelados.....	14
1.6.4 Algas rojas	14
1.6.5 Algas pardas	14

1.6.6 Algas azul-verdosas ó cianobacterias	15
1.7 Microalgas	15
1.7.1 Cultivo de microalgas.....	18
1.7.2 Aspectos importantes del cultivo de microalgas	19
1.7.3 Pigmentos naturales.....	22
1.8 Reología.....	24
1.8.1 Parámetros reológicos.....	24
1.9 Biofijación de dióxido de carbono por microalgas	26
1.10 Biorreactores para la producción de microalgas	27
1.10.1 Desarrollos recientes en fotobiorreactores	29
1.11 Creación de conocimiento y generación de ideas	31
1.12 Software de Innovación Asistida por Computadora	32
1.13 Teoría para resolver problemas de innovación	33
1.14 Las contradicciones como un medio de resolver problemas.....	34
CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA	37
2.1 Etapa 1: Obtención y caracterización de las microalgas.....	38
2.2 Etapa 2: Determinación de la dosis recomendable de MBB y Utex	39
2.3 Etapa 3: Definición de los niveles recomendables de las variables luminosidad y CO ₂	41

2.3.1 Intensidad luminosa.....	42
2.3.2 pH.....	43
2.3.3 Alcalinidad total.....	43
2.3.4 Densidad celular	44
2.3.5 Biomasa por peso seco	44
2.3.6 Contenido de carbohidratos	45
2.3.7 Lípidos.....	46
2.3.8 Proteínas totales.....	46
2.3.9 Determinación de pigmentos	47
2.3.10 Tasa de crecimiento celular	47
2.3.11 Tasa de fijación de CO ₂	48
2.4 Etapa 4: Estudios de la calidad y propiedades reológicas de la biomasa obtenida...	48
2.5 Etapa 5: Diseño de un fotobiorreactor airlift a escala piloto	49
2.5.1 Montaje del fotobiorreactor airlift a escala piloto	50
2.5.2 Operación del fotobiorreactor airlift a escala piloto.....	51
2.6 Resolución de contradicciones.....	52
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
3.1 Obtención y adaptación de las microalgas	54
3.2 Medios y condiciones de cultivo	55

3.3 Determinación de la dosis recomendable MBB para <i>Chlorella spp.</i>	56
3.3.1 Comportamiento de pH en <i>Chlorella spp.</i>	57
3.3.2 Curva de calibración <i>Chlorella spp.</i>	59
3.4 Determinación de la dosis recomendable UTEX para <i>Spirulina máxima</i>	60
3.4.1 Comportamiento de pH en <i>Spirulina máxima</i>	62
3.5 Definición de los niveles recomendables de luminosidad y CO ₂	63
3.5.1 Diseño experimental 3 ² para <i>Chlorella spp.</i>	64
3.5.2 Densidad celular	64
3.5.3 pH	68
3.5.4 Caracterización de la biomasa obtenida durante las pruebas a nivel laboratorio.....	71
3.6 Propiedades reológicas de la biomasa obtenida	75
3.6.1 Reología de la microalga <i>Chlorella spp.</i>	75
3.6.2 Reología de la microalga <i>Spirulina máxima</i>	79
3.7 Correlación de propiedades reológicas.....	83
3.8 Diseño de un fotobiorreactor airlift a escala piloto.....	85
3.8.1 Montaje de los fotobiorreactores airlift a escala piloto	92
3.9 Operación del fotobiorreactor con suministro de CO ₂ a nivel planta piloto	93
3.9.1 Densidad celular y pH de <i>Chlorella spp.</i>	93

3.9.2 Producción de biomasa y tasa de fijación de CO ₂	95
3.9.3 Caracterización de biomasa de <i>Chlorella spp.</i>	97
3.10 Contradicciones en fotobiorreactores airlift	99
3.11 Estrategias de operación de fotobiorreactores	101
3.12 Análisis bioquímico del proceso de absorción de CO ₂	102
CONCLUSIONES.....	106
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
PRODUCTOS ACADÉMICOS	123
ANEXO A: Elaboración de medio de cultivo Bold Basal (MBB)	135
ANEXO B: Elaboración de medio de cultivo Utex	136
ANEXO C: Datos reológicos fase inicial de cultivo.....	138
ANEXO D: Datos reológicos fase exponencial de cultivo.....	139
ANEXO E: Datos reológicos máximo crecimiento.....	140
ANEXO F: Diagrama de bloques Planta Piloto	141
ANEXO G: Diagrama de flujo Planta Piloto	142
ANEXO H: Diseño de Planta Piloto	143
ANEXO I: Diagrama P&ID Planta Piloto	144
ANEXO J: Diagrama AutoCAD	146

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Distribución de emisiones por sectores en México.....	9
Figura 1.2 Emisión de gases de efecto invernadero en la zona metropolitana del Valle de México.....	9
Figura 1.3 Curva representativa de crecimiento de un cultivo de microalgas en un volumen limitado.....	17
Figura 1.4 Trayectoria de la luz y de los ciclos luz/oscuridad.....	20
Figura 1.5 Evolución de la tasa de crecimiento en función de la intensidad luminosa para distintas temperaturas.....	20
Figura 1.6 Clasificación de los pigmentos naturales.....	23
Figura 1.7 Perfil de velocidades para un fluido entre platos paralelos.....	24
Figura 1.8 Tipos básicos de fotobiorreactores.....	28
Figura 2.1 Metodología experimental.....	38
Figura 2.2 Adaptación de las microalgas.....	39
Figura 2.3 Soluciones stock medio Bold Basal.....	38
Figura 2.4 Medidor de intensidad luminosa (Luxómetro).....	43
Figura 2.5 Potenciómetro.....	43
Figura 2.6 Cámara de Neubauer.....	44
Figura 2.7 Espectrofotómetro.....	45
Figura 2.8 Sistema de extracción Soxhlet.....	46
Figura 2.9 Equipo Kjendahl.....	47
Figura 2.10 Reómetro Anton Paar.....	49
Figura 3.1 Obtención de las microalgas.....	54
Figura 3.2 Microalga <i>Chlorella spp.</i> y <i>Spirulina máxima</i>	55

Figura 3.3 Cinéticas de crecimiento de <i>Chlorella spp.</i> a diferentes dosis de MBB.....	56
Figura 3.4 Comportamiento de pH en <i>Chlorella spp.</i> a diferentes dosis de MBB.....	58
Figura 3.5 Curva de calibración de la microalga <i>Chlorella spp.</i>	60
Figura 3.6 Cinéticas de crecimiento de <i>Spirulina máxima</i> a diferentes dosis de medio Utex.....	61
Figura 3.7 Comportamiento de pH en <i>Spirulina máxima</i> a diferentes dosis de medio Utex.....	63
Figura 3.8 Crecimiento celular de <i>Chlorella spp.</i> a diferentes condiciones de luminosidad y CO ₂	65
Figura 3.9 Gráfico de interacción “CO ₂ -crecimiento”	67
Figura 3.10 Gráfico de interacción “Iluminación-crecimiento”	68
Figura 3.11 Gráfico de interacciones “CO ₂ -Iluminación-Crecimiento”	68
Figura 3.12 Comportamiento de pH a diferentes concentraciones de CO ₂ y luminosidad de 2000 lux.....	69
Figura 3.13 Comportamiento de pH a diferentes concentraciones de CO ₂ y luminosidad de 3000 lux.....	70
Figura 3.14 Comportamiento de pH a diferentes concentraciones de CO ₂ y luminosidad de 4000 lux.....	70
Figura 3.15 Curva patrón de carbohidratos.....	71
Figura 3.16 Peso seco de la microalga <i>Chlorella spp.</i>	74
Figura 3.17 Datos experimentales vs modelo H-B (fase inicial de cultivo).....	76
Figura 3.18 Datos experimentales vs modelo H-B (fase exponencial de cultivo).....	77
Figura 3.19 Datos experimentales vs modelo H-B (fase máxima).....	78
Figura 3.20 Datos experimentales vs modelo H-B (fase inicial de cultivo).....	79
Figura 3.21 Datos experimentales vs modelo H-B (fase exponencial de cultivo).....	81
Figura 3.22 Datos experimentales vs modelo H-B (fase máxima).....	82

Figura 3.23 Correlación de η con densidad celular.....	83
Figura 3.24 Correlación de viscosidad con densidad celular.....	84
Figura 3.25 Montaje de la sección de fotobiorreactores nivel planta piloto.....	92
Figura 3.26 Planta piloto de la sección de fotobiorreactores.....	93
Figura 3.27 Curva de crecimiento de <i>Chlorella spp.</i> en el fotobiorreactor.....	94
Figura 3.28 Comportamiento de <i>Chlorella spp.</i> en el fotobiorreactor.....	95
Figura 3.29 %Remoción de CO ₂ y producción de O ₂	97
Figura 3.30 Estrategias de operación de fotobiorreactores.....	102
Figura 3.31 Mecanismo bioquímico de absorción de CO ₂	103
Figura 3.32 Absorción de CO ₂	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Vigilancia tecnológica de fotobiorreactores.....	29
Tabla 2.1 Dosis suministradas a <i>Chlorella spp</i>	40
Tabla 2.2 Dosis suministradas a <i>Spirulina máxima</i>	41
Tabla 2.3 Factores y niveles del diseño factorial.....	41
Tabla 2.4 Condiciones de operación de los fotobiorreactores.....	42
Tabla 3.1 ANOVA de las cinéticas de diferentes dosis de MBB.....	57
Tabla 3.2 Prueba de Fisher para las cinéticas diferentes dosis de MBB.....	57
Tabla 3.3 Comportamiento de pH durante las cinéticas.....	59
Tabla 3.4 ANOVA de las cinéticas de diferentes dosis de medio Utex.....	61
Tabla 3.5 Prueba de Fisher para las cinéticas de diferentes dosis de medio Utex.....	62
Tabla 3.6 Comportamiento de pH durante las cinéticas de <i>Spirulina máxima</i>	63
Tabla 3.7 ANOVA del crecimiento celular a diferentes condiciones de luminosidad y CO ₂	65
Tabla 3.8 Prueba de Fisher crecimiento celular: término luminosidad.....	67
Tabla 3.9 Prueba de Fisher crecimiento celular: término CO ₂	67
Tabla 3.10 Caracterización de la biomasa de <i>Chlorella spp</i>	73
Tabla 3.11 Caracterización de la biomasa de <i>Spirulina máxima</i>	73
Tabla 3.12 Tasa de crecimiento celular.....	74
Tabla 3.13 Densidad celular e índice de comportamiento.....	84
Tabla 3.14 Densidad celular y viscosidad.....	85
Tabla 3.15 Producción de biomasa y tasa de fijación de CO ₂ a 400 lux.....	96
Tabla 3.16 Caracterización de biomasa de <i>Chlorella spp</i>	98

INTRODUCCIÓN

Desde la era preindustrial, la concentración atmosférica de los gases invernadero ha ido aumentando de forma significativa. Estos incrementos son debido a emisiones de los gases invernadero, causadas fundamentalmente, por actividades antropogénicas como lo son la quema de combustibles fósiles, producción de refrigerantes, deforestación, cambio de uso de suelo, quema de biomasa, etc. (PNUMA, 2015).

Entre la gran cantidad de emisiones de gases a la atmósfera, el CO₂ es el gas que más ha contribuido al efecto invernadero. El nivel actual de concentración de dióxido de carbono es el más alto de las últimas décadas, aumentando aceleradamente de 200 a 338 ppm, y con esto aumentan los desafíos extraordinarios que los cambios climáticos y eventos naturales extremos cada vez más frecuentes y peores. Para finales de este siglo, se espera que la temperatura media global en la superficie incrementará entre 1.5 °C y 6 °C. Se pronostica que el nivel del mar se eleve entre 9 y 88 cm en los próximos cien años y con esto se incrementan significativamente los riesgos para los seres humanos y los ecosistemas, sufriendo daños irreversibles. Además, está el riesgo de la elevación del nivel del mar debido al derretimiento acelerado de los glaciares del mundo y la expansión térmica de los océanos (SEMARNAT, 2016).

La repercusión del calentamiento global sobre la vida humana, el sustento y las economías puede ser significativa. Se requiere, por lo tanto, desarrollar nuevas tecnologías y estudios que contribuyan a reducir las emisiones excesivas de dióxido de carbono, generadas por la combustión gases y otros procesos.

Una de las alternativas para disminuir la concentración del CO₂, puede ser la fijación por medio de microorganismos fotosintéticos, como las microalgas que se desarrollan naturalmente en medios acuáticos y utilizan el CO₂ como fuente de carbono para la síntesis de componentes orgánicos. Las microalgas captan y almacenan carbono para su crecimiento proveniente del CO₂, tienen elevadas tasas de crecimiento, llegando a doblar su población en aproximadamente de 24 a 48 horas (Plata, 2013).

En el cultivo masivo de microalgas, los fotobiorreactores tubulares y de placas planas han recibido mucha atención ya que permiten establecer cultivos de alta densidad celular, tres o más veces en

comparación con los sistemas convencionales. Tiene como ventajas la factibilidad para cosechar biomasa, mantenimiento del cultivo sin contaminación, mejor control de las condiciones de cultivo, mejor inversión de capital en el fotobiorreactor; éste último factor es un elemento importante en el costo de producción de productos derivados de microalgas (Contreras *et al.*, 2013).

Por lo tanto, las tecnologías basadas en fotobiorreactores con microalgas podrían proporcionar una herramienta clave para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. Debido a que son ricas en lípidos y pueden crecer a diferentes condiciones, se puede obtener una biomasa rica en nutrientes para consumo humano, y por otra parte obtener pigmentos de origen natural más económicos que los existentes para materias primas (Mora *et al.*, 2014).

OBJETIVOS

Objetivo General

- ❖ Desarrollar las estrategias de operación de fotobiorreactores para la producción de pigmentos y nutrientes a partir de microalgas.

Objetivos Específicos

- ❖ Determinar la dosis recomendable de nutrientes para el óptimo crecimiento de la microalga *Chlorella spp* y *Spirulina máxima*.
- ❖ Evaluar el efecto de las variables ambientales en el contenido de clorofila, carbohidratos, lípidos y proteínas en las microalgas *Chlorella spp* y *Spirulina máxima*.
- ❖ Estudiar la calidad y propiedades reológicas de la biomasa obtenida al final de los tratamientos.
- ❖ Diseñar un prototipo de fotobiorreactor, así como su implementación y operación en planta piloto.
- ❖ Identificar los problemas inventivos en el diseño del fotobiorreactor.

JUSTIFICACIÓN

La producción y el consumo de energía son fundamentales para el desarrollo de las actividades humanas en las sociedades modernas, indispensables en el transporte, la industria y el comercio, y en actividades básicas para la supervivencia como la conservación y cocción de alimentos.

La relación entre la energía y la actividad económica es estrecha, por ello, la puesta en marcha de las soluciones a los problemas planteados por el cambio climático, particularmente la mitigación de las emisiones de los gases de efecto invernadero, implican el reto de no afectar el desarrollo de las naciones.

Es previsible que en países como México, con economías en desarrollo, continuarán incrementándose las emisiones de gases de efecto invernadero asociados al aumento en la generación y el consumo de energía, estos últimos indispensables para impulsar el desarrollo económico y demandados por el rápido crecimiento demográfico.

Los gases de efecto invernadero, en especial el CO₂, son considerados como el principal factor que contribuye a los problemas de calentamiento global. Por lo tanto, controlar los niveles de CO₂ en el ambiente, y reducir eficazmente las emisiones de CO₂, son un medio práctico de controlar el problema del calentamiento global. Los investigadores se han dedicado a la evolución técnica para mejorar la eficiencia energética o la utilización de la energía sostenible para reducir el consumo de combustibles fósiles convencionales, como el carbón y petróleo, con el fin de reducir las emisiones de CO₂ a la atmósfera (Fang-Fang, 2015).

La captura y almacenamiento de CO₂ es un método directo para reducir las emisiones de CO₂ debido al uso de combustibles fósiles. En los últimos años, diversos estudios se han llevado a cabo para mitigar las emisiones de CO₂ en el sector industrial.

Por lo tanto, es necesario y valioso desarrollar una técnica que permita eliminar o fijar directamente el CO₂. Los organismos autótrofos, tales como las microalgas son un candidato prometedor para la técnica de captura de CO₂ (Kumar, 2016), y una alternativa de tratamiento es el diseño, construcción e implementación de un biorreactor de microalgas para remoción de bióxido de carbono.

El presente proyecto plantea la posibilidad a partir de la remoción de CO₂, de definir los mecanismos de crecimiento de microalgas, estableciendo los factores y niveles de las diversas variables estudiadas, tales como la temperatura, intensidad luminosa, etc., para las diferentes rutas metabólicas: obtención de biomasa y/o pigmentos; además de su estudio en el comportamiento de las propiedades reológicas con el fin de establecer las bases en los parámetros necesarios para el diseño de un prototipo de fotobiorreactor.

Este último punto es de gran importancia ya que nuestro país presenta un atraso tecnológico significativo, así, tiene un valor agregado impulsar tecnologías generadoras de energía y que además sus productos pueden ser aprovechados en otros campos de la investigación en beneficio humano, impulsando así la disminución de emisiones contaminantes hacia la atmósfera, obteniendo un producto de valor agregado (biomasa) que puede ser utilizado como fuente de nutrientes para consumo humano o como pigmentos de origen natural (materia prima) para diversas industrias como la cosmética.

HIPÓTESIS

Hipótesis general

Mediante el uso de las herramientas de innovación y el aprovechamiento de mecanismos de alto rendimiento de crecimiento poblacional de microalgas mediante una configuración tipo airlift es posible mejorar sustancialmente los procesos actuales de remoción de CO₂ y la obtención de biomasa rica en nutrientes y pigmentos en fotobiorreactores.



**FUNDAMENTOS
TEÓRICOS**

CÁPITULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Antecedentes

Los gases de efecto invernadero, en especial el CO₂, son considerados como el principal factor que contribuye a los problemas de calentamiento global (UN, 2015). Por lo tanto, controlar los niveles de CO₂ en el ambiente y reducir eficazmente las emisiones de CO₂, es un medio práctico de controlar el problema del calentamiento global. Los investigadores se han dedicado a la evolución técnica para mejorar la eficiencia energética o la utilización de la energía sostenible para reducir el consumo de combustibles fósiles convencionales, como el carbón y petróleo, con el fin de reducir las emisiones de CO₂ a la atmósfera (Fang-Fang *et al.*, 2011).

La captura y almacenamiento de CO₂ es un método directo para reducir las emisiones de CO₂ debido al uso de combustibles fósiles. En los últimos años, diversos estudios se han llevado a cabo para mitigar las emisiones de CO₂ en el sector industrial, desarrollándose técnicas fisicoquímicas, tales como la absorción, la inyección directa en los océanos y estratos geológicos y la fijación biológica. No obstante, los materiales adsorbentes como el LiOH requieren un espacio significativo para el almacenamiento. Estos métodos presentan desafíos significativos, incluidos los requisitos de espacio y la necesidad de separar y purificar el CO₂ de los gases de combustión, lo que resulta en un costo elevado (Metz *et al.*, 2005). Por lo tanto, la mitigación biológica es la única tecnología económicamente viable y ambientalmente sostenible a largo plazo.

1.2 Contexto nacional de las emisiones de CO₂

De acuerdo con el Inventario Nacional de Gases de Efecto Invernadero 2014-2016, México emitió 514 Mton de CO₂ en 2016, que representan aproximadamente el 2.5% de las emisiones mundiales. Durante el mismo año se emitieron 691 Mton de bióxido de carbono, de las cuales, el 74% correspondieron a CO₂, el 24% a CH₄ y el 2% a N₂O (SEMARNAT, 2016).

El 32% de las emisiones nacionales de GEI en 2014 fue el resultado de procesos de combustión, incluyendo aquí a las originadas por los procesos de combustión interna para el transporte (219 Mton de CO₂ equivalente), como se puede observar en la figura 1.1.

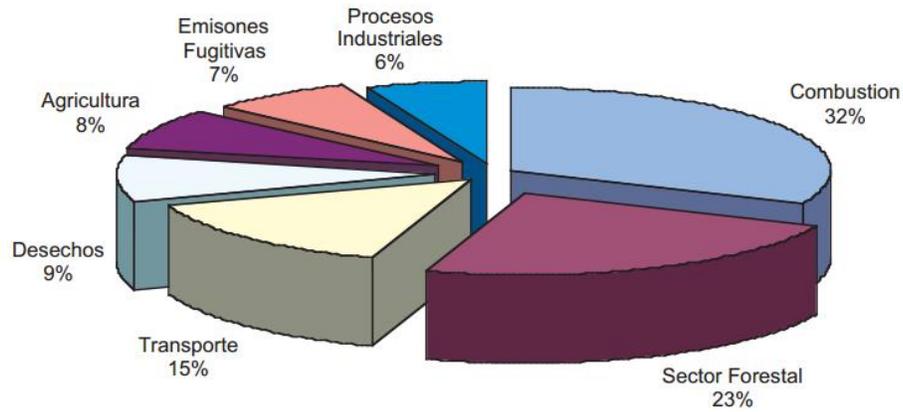


Figura 1.1 Distribución de emisiones por sectores en México (SEMARNAT, 2014)

Durante el año 2016, la zona metropolitana del Valle de México emitió 57.4 Mton de CO₂, lo que representa el 8.2% de las emisiones nacionales (figura 1.2). Este porcentaje relativamente bajo se explica en parte porque las industrias petrolera y de generación de energía eléctrica (que se encuentran entre las mayores emisoras) están ubicadas fuera de la zona metropolitana del Valle de México.

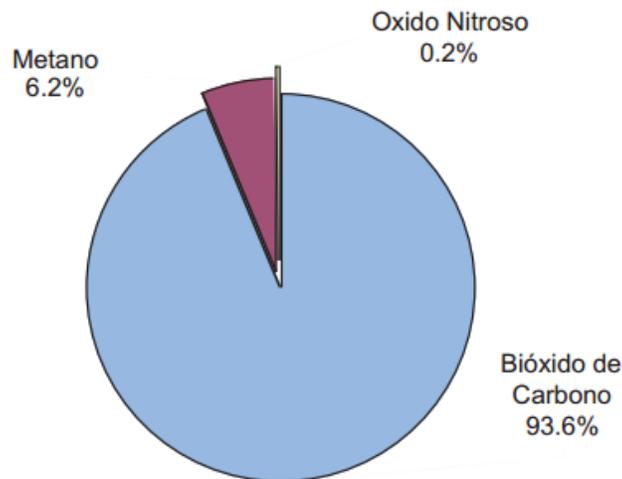


Figura 1.2 Emisión de gases de efecto invernadero en la zona metropolitana del Valle de México (SEMARNAT, 2014)

Las principales emisiones de bióxido de carbono y óxido nitroso provinieron del consumo de combustibles y electricidad, los cuales generaron 99% del CO₂ y 93% del N₂O, respectivamente; mientras que la principal fuente emisora de metano fueron los residuos sólidos al generar 95% de este gas.

La energía, entendida como el consumo de combustibles incluidos los destinados a la generación de electricidad, es la principal fuente de emisiones de GEI. Cuatro energéticos son responsables del 96% de las emisiones de GEI originadas en la quema de combustibles: gasolina (48%), gas natural (22%), GLP (15%) y el diesel (11%).

De acuerdo con las emisiones por PIB y per cápita, México está a gran distancia de los principales emisores de carbono, si bien en términos de emisiones totales ocupa el catorceavo lugar, lo que es comprensible dada la magnitud de su población, la extensión de su territorio y su nivel de desarrollo (INE, 2013).

1.3 Digestión anaerobia y la producción de CO₂

Los procesos industriales, cualquiera que sea, independientemente de su calidad y cantidad de producción, deben considerar el cuidado al medio ambiente y el tratamiento de sus residuos peligrosos como parte de su proceso integral. El proceso de digestión anaerobia que si bien es una alternativa para el tratamiento de residuos orgánicos, produce metano (55%-70%) y dióxido de carbono (30%-45%) como producto final (Varnero *et al.*, 2012), este último debe ser tratado para evitar su emisión a la atmósfera.

La planta piloto de digestión anaerobia ubicada dentro del instituto Tecnológico de Orizaba, espera obtener una producción diaria de 5 m³ de biogás, lo que generaría 1000 L de dióxido de carbono. Como parte de un proceso integral, se espera tratar el dióxido de carbono que será generado, lo que hará que la planta piloto cuente con un proceso autosustentable, y una vez demostrada su aplicabilidad, podrá ser implementado en todos los procesos de digestión anaerobia al igual que en otros procesos que generen dióxido de carbono.

1.4 Tecnologías de captura y almacenamiento de CO₂

De acuerdo con Muñoz *et al.*, (2011), las tecnologías de captura y almacenamiento de CO₂ pueden dividirse en:

❖ 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. Los procesos de adsorción por cambio de presión se utilizan fundamentalmente para la producción de oxígeno mediante la separación del nitrógeno del aire.

❖ Separación de gases mediante membranas

La separación de gases mediante membranas no requiere un cambio de fase, por lo que hay un ahorro energético significativo. Adicionalmente, las unidades de separación de gases suelen tener un tamaño menor que otras instalaciones de captura de CO₂, por lo que su impacto medioambiental también es menor. Las técnicas de separación de gases mediante membranas se pueden considerar un proceso intermedio entre la adsorción y la absorción.

❖ 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 CO₂, se regenera mediante la aplicación de calor o presión, dependiendo del disolvente. El CO₂ capturado se separa del absorbente y se captura, mientras que el absorbente se recicla.

❖ Separación criogénica

Cuando los gases tienen diferentes puntos de ebullición, se pueden separar enfriándolos hasta que alcanzan dos estados diferentes. Los procesos de criogenización se han utilizado ampliamente para separar gases en corrientes de aire muy puras. La separación de CO₂ 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 CO₂.

❖ Carbonatación mineral

Permite capturar el CO₂ a través de la carbonatación, para luego mediante la calcinación obtener nuevamente el disolvente. Las reacciones de los elementos (Calcio y Litio) para formar los carbonatos se producen a altas temperaturas (~ 600 °C). La calcinación (o regeneración) también se produce a altas temperaturas (~ 1,000 °C) en otro reactor.

❖ Captura de CO₂ mediante algas

Las algas, como cualquier otra especie vegetal, toman el CO₂ de la atmósfera para realizar el proceso de fotosíntesis para su crecimiento. Esta propiedad de las algas puede utilizarse para capturar el CO₂ presente en los gases procedentes de la combustión en una planta de generación eléctrica o una planta industrial.

Esta tecnología consiste en el desarrollo de un fotobiorreactor (FBR) que, a partir de aguas residuales y del CO₂ 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 (biodisel) en sustitución de combustibles fósiles (González-López *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2016).

Los reactores industriales para cultivo de microalgas generalmente son estanques abiertos, y sistemas cerrados comúnmente llamados fotobiorreactores. La producción de microalgas en sistemas cerrados como fotobiorreactores tiene un costo elevado. Sin embargo, los sistemas cerrados requieren mucho menos luz para el cultivo de las microalgas (Demirbas *et al.*, 2010).

1.5 Las algas

Las más sencillas de las plantas no vasculares (sin tejido especializado para transportar el agua y el alimento a través del cuerpo de la planta) son las algas, no se clasifican dentro del reino vegetal, es decir, no son plantas. Se trata de un grupo polifilético o artificial, y no tiene, por lo tanto, uso en la clasificación científica moderna, aunque sigue teniendo utilidad en la descripción de los sistemas acuáticos (Catzim y López, 2011).

La cantidad de grupos actualmente reconocidos como parte de las algas es grande y por supuesto, con diversas sus características. Abarcan desde organismos unicelulares hasta plantas de más de diez metros de longitud.

Las algas viven tanto en agua dulce como en agua salada. Se consideran talófitas, es decir, no poseen raíz, tallo y hojas; 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

1.6 Clasificación de las algas

El sistema de clasificación de las algas varía según el autor, siendo el número de clasificaciones entre cuatro y nueve. Esta variación es explicada en parte por la posición asignada a las algas azul-verdosas, consideradas recientemente como un tipo de bacterias por su afinidad y tipo de célula procariótica (un tipo de célula con menor grado evolutivo); adicional a este grupo se reconocen tres grupos de algas eucarióticas (un tipo de célula con mayor grado evolutivo): Las algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta) y las algas pardas (Phaeophyta) (Peña *et al.*, 2005). Otro grupo de algas con características disímiles corresponde a las algas azul-verdosas, consideradas como un tipo de bacterias, particularmente por su célula primitiva. Las algas además de proveer cerca de la mitad de producción primaria total del mundo, de la cual dependen gran parte de los productores secundarios acuáticos, participan en los diferentes ciclos biogeoquímicos globales, con la producción de oxígeno atmosférico y la regulación del clima.

1.6.1 Algas verdes

Tienen paredes celulares de celulosa, contienen clorofila a y b y almacenan almidón al igual que las plantas. Se cree que dieron origen a las plantas terrestres. Casi todas las algas verdes son microscópicas, aunque pueden ser unicelulares o multicelulares. Su distribución es muy amplia y están presentes en todos los ambientes acuáticos como los ríos, lagos y mares.

Dentro de esta división existen dos grupos importantes llamados comúnmente diatomeas y dinoflagelados. Ambos subgrupos se distribuyen ampliamente en aguas saladas y dulces y juegan un papel muy importante como constituyente de la vegetación acuática (Peña *et al.*, 2015).

1.6.2 Diatomeas

Son un tipo de algas verdes unicelulares sin ningún tipo de flagelo y su principal característica es la presencia de un esqueleto de sílice que rodea la célula y le confiere una dureza especial. Su cubierta está conformada por dos valvas que encajan una con otra. Cuando esta especie de esqueleto se acumula por muchos años en el fondo del agua, constituye la llamada tierra de diatomeas, producto comercial utilizado para varios fines como pulimento de metales y pasta de dientes, filtración de líquidos, en el control de temperaturas de hornos industriales y como material inerte en la fabricación de dinamita (Shabnam *et al.*, 2015).

1.6.3 Dinoflagelados

Son algas unicelulares dominantes en el agua de mar y en menor proporción en el agua dulce, reciben el nombre colectivo de plancton (Tortora *et al.*, 2007) y una de sus características principales son los flagelos de donde derivan su nombre. Los dinoflagelados son los responsables de las mareas rojas, fenómenos que ocurren en aguas costeras por la proliferación de estas algas en especial de dos géneros: *Gonyaulax* y *Peridinium*. Estos poseen pigmentos rojos disueltos en glóbulos de aceite que en grandes cantidades le imprimen un color rojizo (Shabnam., 2015).

1.6.4 Algas rojas

Son llamadas también florídeas por su almidón de reserva y constituyen un grupo de algas más diverso y dominante en el agua de mar. Se diferencian de las demás por no poseer ningún tipo de flagelo y por la presencia de un pigmento fotosintético característico llamado ficobilina (ficoeritrina y ficocianina) que da el color propio a las algas rojas. Sus células contienen también otros pigmentos como los carotenos y las xantofilas que aparecen también en la zanahoria.

1.6.5 Algas pardas

Deben su nombre a su coloración predominante: determinada en gran parte por los tipos de pigmentos: clorofila a, c, beta-caroteno, violaxatina y fucoxantina. Constituyen un grupo importante con alrededor de 1500 especies, no presentan formas unicelulares ni etapas vegetativas (no reproductivas) móviles. La reserva alimenticia principal se conoce como

laminarina, un polímero de la glucosa que es el principal azúcar de las plantas. También cuenta como reserva en su pared celular con el ácido algínico que tiene un alto valor comercial y es utilizado como emulsificante y estabilizante en la industria alimenticia y farmacéutica (Harun *et al.*, 2010).

1.6.6 Algas azul-verdosas ó cianobacterias

Son caracterizados como organismos procarióticos. Su estructura celular posee características de una célula primitiva, tales como la ausencia de una membrana que rodee el núcleo de la célula y ausencia de cromosomas. No poseen estructuras internas tales como los cloroplastos o mitocondrias, las cuales cumplen funciones específicas para el funcionamiento de la célula. La utilización del microscopio electrónico y nuevos métodos bioquímicos ha permitido conocer muchos aspectos y establecer afinidades con la estructura de las bacterias. Aunque se asemejan a las algas eucariontes y a menudo ocupan los mismos nichos ambientales se trata de una denominación errónea porque son bacterias, no algas, sin embargo llevan a cabo la fotosíntesis como producción de oxígeno (oxigénicas) como lo hacen las plantas y las algas eucariontes.

Las especies que crecen en el agua suelen tener vacuolas de gas que les proporcionan flotabilidad y ayudan a que la célula flote en un ambiente favorable; las cianobacterias que se mueven sobre una superficie sólida utilizan el mecanismo de deslizamiento. Presentan variaciones morfológicas en las que figuran formas unicelulares que se dividen por simple fisión binaria, formas coloniales que se dividen por fisión múltiple, y formas filamentosas que se reproducen por fragmentación de los filamentos.

1.7 Microalgas

Son organismos microscópicos fotosintéticos eucariotas que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica, capaces de producir oxígeno a partir de la radiación solar. Esta actividad la llevan a cabo gracias a unas estructuras especiales denominadas cloroplastos, en las cuales se encuentran diversos pigmentos (clorofilas, ficobilinas, carotenos y xantofilas) capaces de “atrapar” la luz solar (Barrientos, 2005) (Siddiqui *et al.*, 2015).

Tienen una alta capacidad para fijar el CO₂ y aprovechar la energía solar para producir biomasa. Así como son ubicuos, tienen una gran diversidad taxonómica. Son el primer eslabón en la cadena trófica. Se calcula que 100 toneladas de microalgas cultivadas absorben 180 toneladas de dióxido de carbono (Camacho-Rodríguez *et al.*, 2015).

En el crecimiento de las microalgas se reconoce un patrón estándar de crecimiento que comprende las siguientes fases:

- Fase de retraso o fase de adaptación: ocurre cuando se observa un incremento limitado en el número de células, pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inóculo inicial.
- Fase de crecimiento exponencial: Ya una vez adaptadas al medio de cultivo, las microalgas comienzan a multiplicarse; siendo proporcional la tasa de crecimiento de células a la concentración de éstas.
- Fase 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.
- Fase estacionaria: Ya no se aprecia una división celular neta, esto es que el número de células alcanzado se mantiene constante por cierto periodo debido al balance entre la natalidad y la mortalidad que presenta la población en cultivo.
- Fase 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 (Romo, 2002).

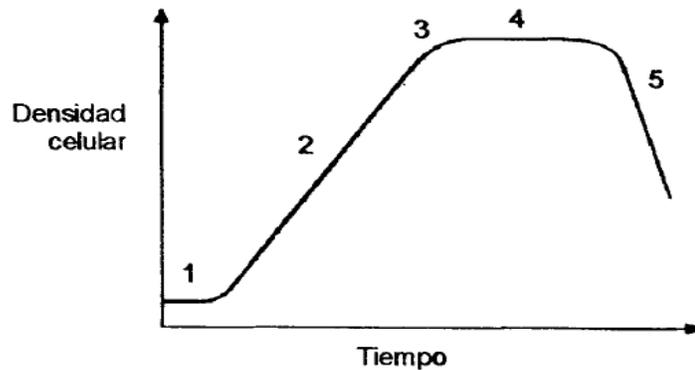


Figura 1.3 Curva representativa de crecimiento de un cultivo de microalgas en un volumen limitado (Romo, 2002). 1.- Fase de adaptación. 2.- Fase de crecimiento exponencial. 3.- Fase de declinación relativa de crecimiento. 4.- Fase estacionaria. 5.- Fase de muerte

Las microalgas han atraído mucha atención debido a su alto valor nutricional y alto valor químico como pigmentos y vitaminas, alta tasa de crecimiento en comparación con las plantas superiores y la capacidad para utilizar la energía de la luz. Además, las microalgas contienen diversos componentes bioactivos; por ejemplo, la biomasa seca puede ser usada como alimentos de alto valor proteínico para animales como el camarón y peces (Demirbas, 2010).

Es por esto que, las microalgas tienen reciente interés en diferentes campos de la investigación. Debido a las propiedades que poseen como antioxidantes han sido relacionadas en numerosos estudios para la prevención de ciertos tipos de cáncer humano. En la industria alimentaria pueden ser utilizadas para la producción de alimentos saludables ricos en proteínas; además ha dedicado también sus esfuerzos en la producción de pigmentos naturales a partir de microalgas hasta el punto de considerar, hoy en día, a estos organismos como la principal fuente natural de ciertos pigmentos altamente demandados en el mercado internacional, como el b-caroteno o la astaxantina. La biomasa obtenida de los cultivos de microalgas puede ser utilizada en la elaboración de biocombustibles (biodiesel), ya que constituyen una fuente aún no suficientemente explotada de energías limpias, cuya ventaja es que no compite con otros cultivos destinados a la alimentación humana.

Las microalgas constituyen, además, un óptimo agente para la fijación de CO₂ atmosférico, lo que podría contribuir a la reducción de las emisiones de este gas, principal responsable del efecto invernadero.

1.7.1 Cultivo de microalgas

El concepto de producción masiva de microalgas se llevó a cabo por primera vez en Alemania durante la II Guerra mundial, dirigido a la producción de lípidos para su uso como fuente de combustible. Se utilizaron las microalgas *Chlorella pirenoidosa* y *Nitzschia palea*. Después de la II Guerra mundial comenzó a considerarse la biomasa microalgal como un suplemento importante e incluso, capaz de reemplazar las proteínas animales o vegetales convencionales para consumo directo del ganado o del hombre, acortando la ineficiente cadena alimentaria proteica.

Así, a partir de 1948, un grupo de científicos de la Carnegie Institution de Washington, realizaron el primer trabajo sistemático que establece los fundamentos científicos del cultivo masivo de microalgas. El objetivo de este proyecto era utilizar el alga verde *Chlorella* para la producción a gran escala de alimentos.

Durante los años 50, el interés mundial por la búsqueda de proteínas para la alimentación amplió los estudios a otras microalgas de agua dulce como *Scenedesmus*, *Coelastrum* y *Spirulina*, además de encontrar otras aplicaciones. Se ha sugerido la aplicación de cultivos masivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales y producción de proteínas simultáneamente, asimismo se desarrollaron sistemas para la producción masiva de microalgas para la bioconversión de energía solar en metano. En los años 60 se desarrollaron sistemas cerrados de cultivo de microalgas para utilizar en misiones espaciales, además se hicieron las primeras pruebas utilizando *Chlorella* en la dieta humana (González *et al.*, 2011).

En la década de los 70 los trabajos de Woods Hole estimularon el desarrollo de sistemas para el cultivo masivo de microalgas marinas, junto con importantes investigaciones básicas. En la década de los 80 se establecen ya numerosas industrias para la producción de microalgas, sobre todo de *Spirulina* y *Dunaliella*. La producción de *Dunaliella* fue pronto considerada como una de las más prometedoras, por su contenido en β -caroteno y sus propiedades terapéuticas.

Dependiendo de la composición de su pared celular, el tipo de clorofila y de pigmentos, entre otras características utilizadas para clasificar a estos microorganismos, permiten que de la gran diversidad de géneros, se puedan seleccionar aquellas que puedan cultivarse. No todas las especies incluidas en este grupo son fotoautótrofas, algunas otras son verdaderamente heterótrofas debido a que no requieren de luz y toman la energía de compuestos orgánicos tales como los azúcares y

ácidos orgánicos, de igual forma, muchas especies son mixotróficas, esto es, que pueden reproducirse en presencia de luz o en la oscuridad (Hoff y Shell, 2001 citado por Romo, 2002).

Las microalgas fotoautótrofas tienen la capacidad de obtener la energía heterotróficamente, dependiendo de sus necesidades alternando en la utilización de la energía luminosa y su transformación a la energía química utilizando bióxido de carbono, así como sustancias orgánicas.

1.7.2 Aspectos importantes del cultivo de microalgas

Los siguientes aspectos fueron tomados en cuenta ya que se consideran como parte medular dentro del cultivo de microalgas. La contaminación de los cultivos de microalgas puede ser biológica, química o física, sin embargo, puede afectar de manera particular o ser una combinación de estos tres tipos.

❖ Luz

Para el cultivo de microorganismos fototróficos, la luz es un requerimiento esencial. El suministro de una luz adecuada, al mismo tiempo que se controla la temperatura, no es una tarea sencilla. Exponiendo los cultivos a la luz del día puede obtenerse una iluminación relativamente incontrolada y discontinua. Debe evitarse la exposición directa a la luz del sol, porque la intensidad puede ser demasiado elevada y la temperatura puede subir hasta un punto en donde el crecimiento se detiene. Muchos microorganismos fototróficos pueden tolerar una iluminación continua y su desarrollo es mucho más rápido bajo estas condiciones, por lo que las fuentes de luz artificial son más ventajosas (Domínguez, 2014).

La radiación luminosa es aquella que está comprendida entre 380 y 750 nm. Dentro de esta se engloba la radiación que tiene influencia en la fotosíntesis o Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR, del inglés Photosynthetically Active Radiation) (Plasencia, 2012).

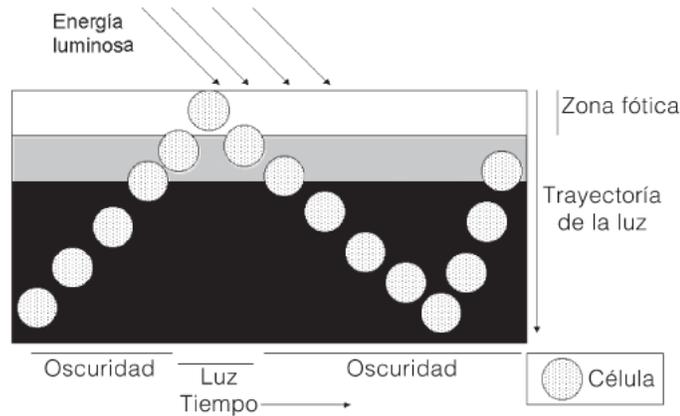


Figura 1.4 Trayectoria de la luz y de los ciclos luz/oscuridad (Contreras *et al.*, 2013).

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. En algunos cultivos se ha estimado que la luz penetra solo de 1 a 2mm más allá de la superficie, de manera que la zona fótica representa solo una pequeña fracción (10-30%) del volumen total del cultivo.

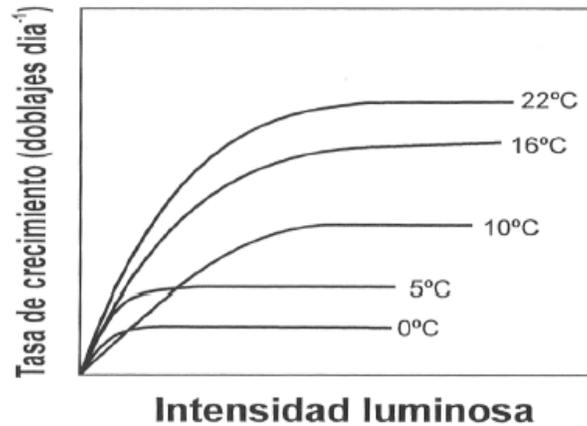


Figura 1.5. Evolución de la tasa de crecimiento en función de la intensidad luminosa para distintas temperaturas (Abalde, 1995).

❖ **Temperatura**

La temperatura del cultivo depende principalmente de la microalga que se emplee y de sus características, pero por otra parte el valor óptimo puede variar en función de los valores de los demás parámetros. Así, la temperatura en condiciones naturales generalmente no coincide con la temperatura óptima en condiciones de cultivo porque los parámetros de cultivo difieren a su vez de los que se dan en su ambiente natural (Plasencia, 2012), como se puede observar en la figura 1.5 existe un nivel de iluminación adecuado para cada temperatura de cultivo.

❖ **Agitación**

La agitación asegura la distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, para así, disponer mejor su aprovechamiento; mejora la distribución de la luz a las células, asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas, evitando que se sedimenten y previniendo una estratificación térmica. En el caso de cultivos a escala laboratorio, la agitación puede realizarse a través de un compresor de acuario y/o ser complementada con la adición de CO₂ para lograr la agitación y enriquecer el cultivo con más carbono disponible para el metabolismo celular (Giordano *et al.*, 2015).

❖ **pH**

La medida del pH en el medio de cultivo es una referencia clave para el desarrollo de un cultivo. El medio de cultivo se alcaliniza por el consumo de la fuente de carbono, lo que genera bases como el NaOH. 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) (De Godos *et al.*, 2014).

❖ **Macronutrientes, micronutrientes y vitaminas**

Los requerimientos nutricionales de las microalgas son semejantes a los de las plantas superiores, a excepción de que varias especies requieren vitaminas para dar una expresión máxima de su potencial de crecimiento. En la naturaleza, en la vida de las microalgas, los nutrientes son almacenados en exceso en cuanto a su requerimiento usual. Esto quiere decir que el crecimiento

puede continuar por algún tiempo después de que se ha llegado al valor más bajo posible de nutrientes en el medio. De manera general se ha encontrado que las microalgas requieren diversos nutrientes y vitaminas, donde la cantidad de éstos dependen de la especie de la microalga (García, 2009).

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.

Por macronutrientes se consideran la fuente de nitratos, fosfatos y en el caso de las diatomeas la adición de silicatos. Con respecto a los micronutrientes son aquellos que se suministran en poca cantidad (trazas) en comparación con los anteriores mencionados. Además de los macro y micronutrientes, existen otras sustancias que son requeridas por las microalgas para obtener mejor crecimiento, éstas sustancias requeridas son las vitaminas entre las que se encuentran la tiamina (B1), cianocobalamina (B12), y biotina (B6) (Giordano *et al.*, 2015).

1.7.3 Pigmentos naturales

❖ Clorofila

La concentración de pigmentos fotosintéticos varía ampliamente y depende del metabolismo algal y de factores fisicoquímicos como la luz, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes. Los pigmentos algales consisten principalmente en clorofilas (a, b y 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 (Cañizares-Villanueva y Perales, 2012).

❖ Xantófilas

Los carotenoides son moléculas con capacidad de absorber energía luminosa en ciertas longitudes de onda, debido a la presencia de múltiples enlaces dobles conjugados. Estos compuestos están constituidos por carbono e hidrógeno y presentan colores en el rango del amarillo al rojo. Las

xantofilas se caracterizan por tener presencia de oxígeno dentro de su molécula (Cañizares-Villanueva y Perales, 2012). Químicamente la mayoría de los carotenoides son tetraterpenoides, compuestos de 40 átomos de carbono formados por ocho unidades de isoprenoides o terpenos (hidrocarburo de 5 átomos de carbono) unidas de forma que la secuencia se invierte en el centro de la molécula. Los carotenoides pueden dividirse en dos grandes grupos: carotenos que son hidrocarburos y xantofilas que contienen átomos de oxígeno (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007) (Kasiri *et al.*, 2015).

La figura 1.6 muestra la clasificación de los pigmentos naturales contenidos en las algas, principalmente divididas en carotenoides y clorofilas.

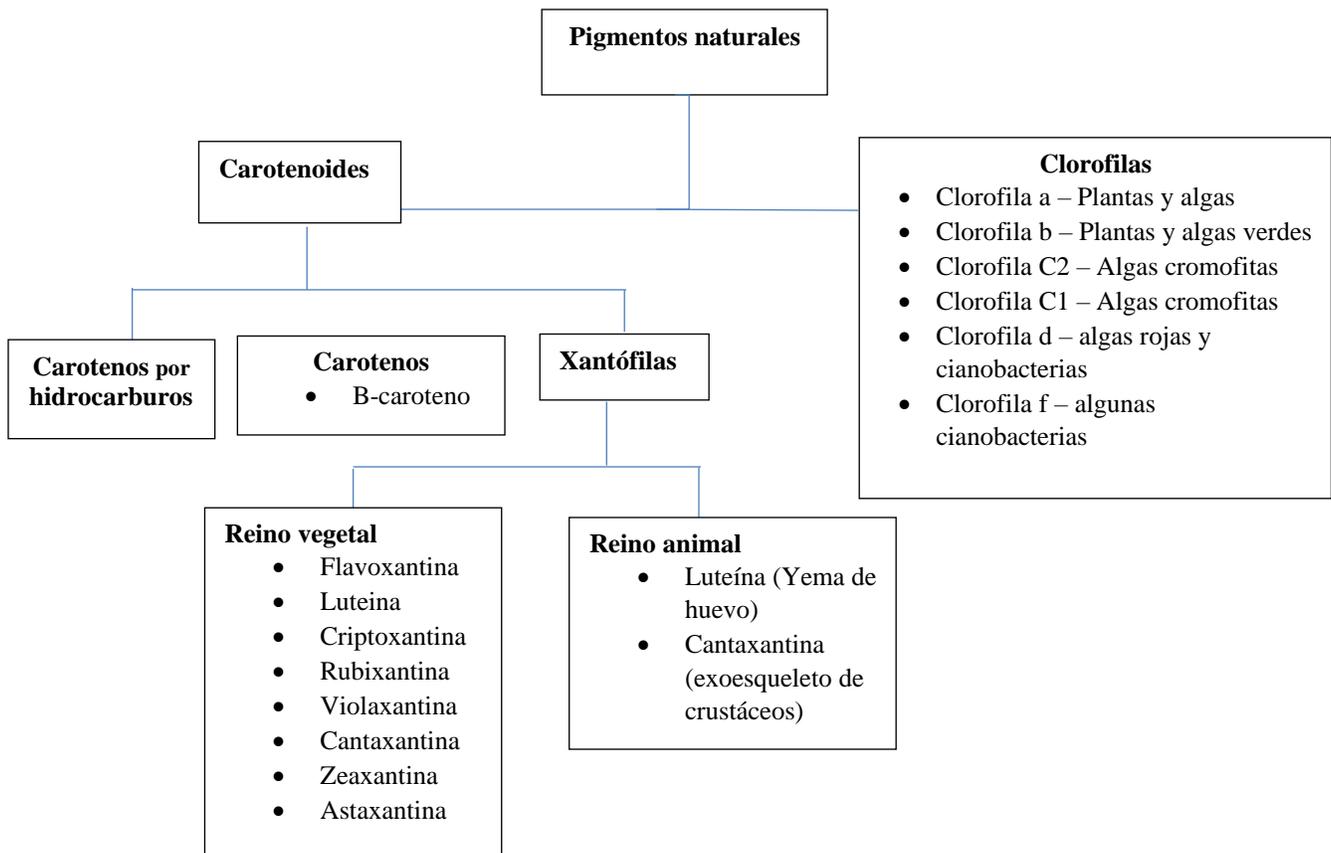


Figura 1.6 Clasificación de los pigmentos naturales (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

1.8 Reología

El término reología fue inventado por el profesor Eugene Bingham Lafayette en 1929 y fue definido como “Ciencia que estudia el flujo y la deformación de la materia bajo fuerzas externas”, más tarde la reología también fue establecida como la ciencia de la deformación y flujo de la materia.

Bird *et al.*,(2006) la definen como la ciencia que incluye todos los aspectos del estudio de la deformación y el flujo de sólidos no-hookeanos y líquidos no-newtonianos.

1.8.1 Parámetros reológicos

La figura 1.7 muestra un fluido sometido a una deformación simple entre dos platos paralelos. El plato inferior es estacionario, mientras que el plato superior se mueve a una velocidad v como consecuencia de una fuerza F aplicada al mismo.

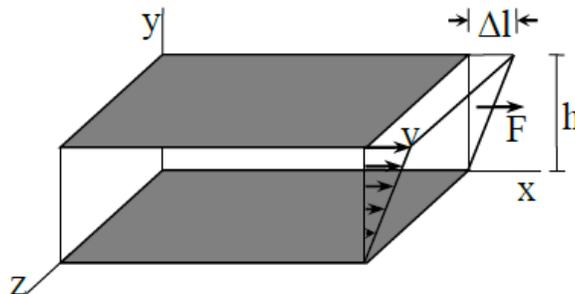


Figura 1.7 Perfil de velocidades para un fluido entre platos paralelos

El movimiento del plato establece un gradiente de velocidad en el fluido. Esta geometría puede ser usada para definir algunos parámetros reológicos tales como:

Esfuerzo de corte o cizalla (τ): Se define como la fuerza por unidad de área necesaria para alcanzar una dada deformación, ecuación 1.1.

$$\tau = \frac{F \text{ (Fuerza)}}{A \text{ (Área)}} = \frac{\text{dina}}{\text{cm}^2} \quad (1.1)$$

Velocidad de corte o cizalla ($\dot{\gamma}$): Se define como el cambio de velocidad v a través de la distancia h entre los dos platos. La velocidad de corte se incrementa a medida que la velocidad del plato superior aumenta y la distancia entre los dos platos se hace más pequeña, ecuación 1.2.

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dh} \left[\frac{\frac{cm}{s}}{cm} \right] = s^{-1} \quad (1.2)$$

Donde:

dv = Cambio de velocidad

dh = Cambio de la distancia entre los platos

El fluido entre los platos resiste el movimiento del plato superior y esta resistencia al flujo es determinada por la viscosidad del fluido.

Viscosidad aparente (η_a): Se define como la relación entre el esfuerzo de corte aplicado y la velocidad de corte adoptada por el fluido. La viscosidad en el sistema de unidades *cgs* se expresa en Poise, ecuación 1.3.

$$\eta_a = \frac{\tau \text{ (Esfuerzo de corte)}}{\dot{\gamma} \text{ (Velocidad de corte)}} = \text{Poise o Pascal} * s \quad (1.3)$$

Esfuerzo de corte inicial (τ_0): Se define como el umbral de esfuerzo o cantidad de movimiento, necesario para que el fluido comience a fluir, desde el valor inicial de la velocidad o tasa de corte cero ($\dot{\gamma}_0$), según la ecuación 1.4.

$$\tau_0 = \tau|_{\dot{\gamma}=0} \quad (1.4)$$

Existen tres métodos para su determinación:

- Método de extrapolación
- Método de relajación
- Método directo (Vane)

De los cuales los dos primeros son inexactos, el tercero se considera el más exacto debido a que es el método experimental que utiliza el accesorio de Vane para muestras con un esfuerzo de corte.

1.9 Biofijación de dióxido de carbono por microalgas

La fijación biológica del CO₂ puede llevarse a cabo por plantas superiores y microalgas sin embargo, las microalgas poseen una mayor capacidad de fijar CO₂. El CO₂ puede provenir de diversas fuentes: CO₂ atmosférico, de las industrias, de los gases de escape como son gases de combustión.

Las microalgas pueden crecer prácticamente en todos los lugares donde la luz del sol sea suficiente. Las microalgas y algunas plantas, utilizan la fotosíntesis para convertir la energía solar en energía química, y almacenan esta energía en forma de aceites, hidratos de carbono, y proteínas. Estos microorganismos realizan la fotosíntesis más rápido, y debido a esto, su tasa de crecimiento es alta.

La tolerancia de varias especies de microalgas en la concentración de CO₂ es variable, sin embargo, las concentraciones de CO₂ en la fase gaseosa, no necesariamente reflejan la concentración de CO₂ a la que está expuesta durante su suspensión en el cultivo, que depende del pH y del gradiente de concentración de CO₂ creado por la resistencia a la transferencia de masa (Kumar *et al.* 2010).

Con el fin de tener un rendimiento óptimo, estos microorganismos necesitan tener CO₂ en cantidades suficientes en las cuencas o biorreactores donde crecen. Por lo tanto el sistema de biorreactores puede acoplarse con hornos de combustión que producen CO₂, suministrándolo al biorreactor, y es asimilado por las microalgas.

Las tecnologías basadas en microalgas podrían proporcionar una herramienta clave para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero de las centrales eléctricas de carbón y otros procesos industriales intensivos de carbono. Debido a que las microalgas son ricas en lípidos y pueden crecer a diferentes condiciones, muchas empresas están apostando a que se pueden crear combustibles u otros productos químicos más baratos que los existentes para materias primas.

El objetivo de la biofijación de CO₂ por microalgas en sistemas a gran escala es remover una fracción significativa del suministro de CO₂ inicial, obteniendo principalmente oxígeno y biomasa (Caballero, 2013).

1.10 Biorreactores para la producción de microalgas

En la década de 1950 se postuló por primera vez el uso de luz solar y agua marina para el cultivo masivo de microalgas ricas en proteínas de alta calidad, podría ser una buena alternativa para obtener alimento para el humano.

En el transcurso de los años se pudieron diversificar las áreas donde las microalgas eucariotas y cianobacterias cultivadas masivamente tienen aplicaciones prometedoras, especialmente en la producción de productos químicos finos y combustibles en el tratamiento de aguas residuales como intercambiadores iónicos y biofertilizantes (Raeesossadati *et al.*, 2014).

Gran variedad de estudios de investigación de diferentes estrategias para la captura de CO₂ se han llevado a cabo desde 1990, de los cuales, los métodos biológicos, en particular la biofijación utilizando microalgas en fotobiorreactores, han ganado mayor interés. Las microalgas tienen una mayor capacidad de fotosíntesis que las plantas terrestres, lo cual plantea la posibilidad de que se pueden utilizar con efectividad para la remoción de CO₂. (Liao *et al.*, 2014).

Existen algunos reportes publicados sobre la eliminación de CO₂ y recuperación de O₂ en espacios cerrados usando la producción fotosintética de microalgas, que está siempre acompañado por el consumo de CO₂ y la generación de O₂ (Chaudhary *et al.*, 2018).

A través de la fotosíntesis, se puede eliminar el CO₂, mientras que se produce oxígeno (O₂), por lo que no será difícil satisfacer la demanda de limpieza de aire. La eliminación del CO₂ en un entorno cerrado, por microalgas cultivadas en un biorreactor, es uno de los métodos de bioregeneración más importante para garantizar un medio ambiente seguro y confiable (Shabnam, 2015).

Por otro lado, los métodos de alimentación de CO₂ necesitan mejorarse aún más. A pesar de que un intercambio eficiente del gas es uno de los cuatro objetivos básicos para la alta densidad en el cultivo de microalgas autótrofas en fotobiorreactores cerrados, el transporte directo por las

burbujas siempre ha sido el método comúnmente adoptado para el de suministro de gas (Ward *et al.*, 2014).

Existen dos diseños básicos para la producción de microorganismos fotoautotróficos: Los sistemas abiertos en los que el cultivo está expuesto a la intemperie, y los sistemas cerrados, comúnmente denominados fotobiorreactores, en los que el cultivo tiene poco o nulo contacto con el exterior.

Los fotobiorreactores tubulares y de placas planas han recibido mucha atención ya que permiten establecer cultivos de alta densidad celular, tres o más veces en comparación con los sistemas convencionales de carrusel. Tiene como ventajas la factibilidad para cosechar biomasa, mantenimiento del cultivo sin contaminación, mejor control de las condiciones de cultivo, mejor inversión de capital en el fotobiorreactor; éste último factor es un elemento importante en el costo de producción de productos derivados de microalgas (Wang *et al.*, 2012).

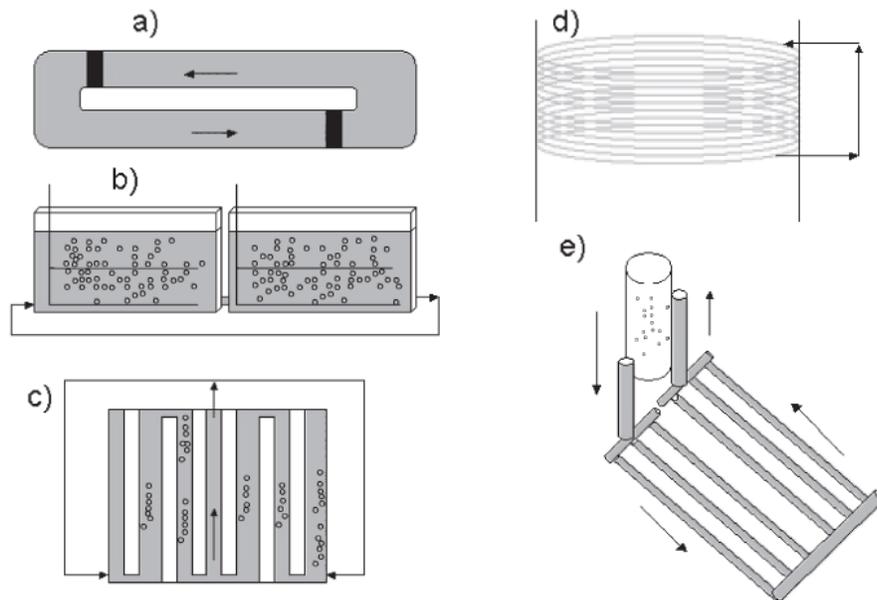


Figura 1.8 Tipos básicos de fotobiorreactores a) Tipo carrusel, vista superior, los bloques negros indican propelas. b) Tipo plano, vista horizontal. c) Con iluminación interna, los bloques blancos indican espacios de iluminación. d) Tipo serpentin. e) Tipo tubular horizontal con sistema airlift (burbujeo). (Contreras *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta que los sistemas cerrados ofrecen más ventajas sobre los sistemas abiertos, entre las que se encuentran mejor calidad en la biomasa producida, un alto control de las

condiciones de cultivo y eficiencia del proceso, bajo riesgo de contaminación del cultivo, flexibilidad de operación y cero dependencia del clima, se han propuesto una gran variedad de diseños en sistemas cerrados tales como los fotobiorreactores, que van desde nivel laboratorio hasta escala industrial, sin embargo a pesar de la variabilidad de los fotobiorreactores, los cuales han estado bajo condiciones de desarrollo durante la década pasada, solo algunos pueden ser utilizados para la producción de biomasa óptima (Singh *et al.*, 2012).

Por ello, uno de los mayores retrocesos en la producción de biomasa es la falta de fotobiorreactores eficientes para mejorar la productividad de las microalgas.

Por lo tanto, se hace necesario diseñar un sistema y modo de operación de un fotobiorreactor que sea adaptable a diferentes condiciones, para ofrecer una mayor productividad y calidad de la biomasa generada.

1.10.1 Desarrollos recientes en fotobiorreactores

A continuación se detallan los principales resultados de la vigilancia tecnológica o monitoreo tecnológico mediante el análisis de patentes relacionadas con fotobiorreactores para el cultivo de microalgas y que permiten identificar y valorar los avances que podrían ser relevantes para el desarrollo de un proyecto actual.

Tabla 1.1 Vigilancia tecnológica de fotobiorreactores

Autor/No. Documento	Descripción	Ventajas/Aplicaciones
Yang Ji Won <i>et al.</i> , (2017) KR20150010127	Fotobiorreactor de placa plana para el cultivo de microalgas. Mide el crecimiento de microalgas mediante el cambio de la sensibilidad fotónica de acuerdo al crecimiento de microalgas a través de un sensor de luz, mide el valor de pH en tiempo real.	Puede realizar la corrección del pH para mantener un valor constante a través de un ácido y/o una base conectada con el exterior. Además tiene una estructura que se puede aplicar tanto a un método de cultivo de lote o un método de cultivo continuo.
Lee Choul G. <i>et al.</i> , (2017) KR20140120433	Fotobiorreactor capaz de controlar de manera eficiente la energía luminosa necesaria para el cultivo de microalgas.	Una parte del contenedor de cultivo tiene una estructura flexible capaz de controlar la

		anchura o la altura del recipiente de cultivo.
Chen Chunyan <i>et al.</i> , (2016) CN203877974	Fotobiorreactor para purificar el biogás mediante el uso de microalgas.	Comprende una válvula de descarga, equipo de iluminación, esterilización, un tubo de entrada de CO ₂ , sensor de pH, iluminación y de nivel de líquido.
Gomis Antonio <i>et al.</i> , (2015) WO2014044883	Fotobiorreactor combinado tipo air-lift para la producción de biomasa. Comprende un cuerpo vertical de forma cilíndrica, medidor de pH, temperatura, un conducto de salida del cultivo, un conducto de entrada de gas adaptado para la circulación de gases.	Presenta un conducto de recirculación interno que permite combinar los efectos air-lift y columna de burbujas.
William R. <i>et al.</i> , (2015) US2014284271	Conjunto de fotobiorreactores de tubos transparentes y verticales del mismo radio de tal manera que la intensidad de la luz está disponible en el centro de cada tubo para una densidad de cultivo máxima esperada para el microorganismo	Suministro de aire capaz de mantener una presión positiva, un purificador de agua, y un suministro de agua conectado al purificador.
L. Wells <i>et al.</i> , (2014) US20140287488	Sistema de acuicultura que incluye un conjunto de bombas, y un depósito mezclador de algas, nutrientes, agua y dióxido de carbono.	Colector solar comunicado con una salida del sistema, un reforzador de nutrientes y regulador de pH se conectan con el tanque.
Martin Anthony Gross (2014) US20140273174	Sistema de crecimiento de algas que incluye un reactor vertical de hoja flexible	Puede ser configurado para facilitar el crecimiento y la fijación de algas.
Bañuelos J. <i>et al.</i> , (2013) MX2013011700	Fotobiorreactor para la producción de biodiesel a partir de microalgas proporcionando el control de temperatura, nutrientes, luz, fuente de carbono y agua purificada	Sistema para la extracción de grasas, que no implican el uso de temperaturas, disolventes y / o maquinaria cara para la obtención del producto deseado.
Zheng Zheng <i>et al.</i> , (2013) CN102992497	Método capaz de purificar y mejorar simultáneamente el biogás para un reactor de múltiples etapas que se forma mediante la conexión de una pluralidad de fotobiorreactores.	El método descrito tiene las ventajas de alta viabilidad y buen beneficio económico.

Tang C. Mark <i>et al.</i> , (2013) WO201304854	Registra un método y sistema de fotobiorreactor para el cultivo de organismos fotosintéticos.	Los métodos son particularmente útiles para la producción de microalgas ricas en grasas como materia prima en la producción de biodiesel, productos químicos, y subproductos de alimentos para animales, etc.
Zhiguo Han <i>et al.</i> , en (2012) CN202450092	Modelo de utilidad que proporciona un sistema para el control del contenido de oxígeno y la actividad fisiológica de microalgas en un fotobiorreactor cerrado.	El sistema puede supervisar la actividad fisiológica de las microalgas, el cambio del contenido de O ₂ y de fluorescencia de clorofila.
Zaglio Enrico (2011) CN103347599	Dispositivo agitador de fluido para facilitar el desarrollo de algas o microalgas en bandejas o fotobiorreactores	Comprende un dispositivo que tiene al menos un módulo fotovoltaico destinado a absorber la radiación de luz con el fin de producir energía eléctrica.
Sang Junbao <i>et al.</i> , (2011) CN103184141	Sistema de fotobiorreactores que contienen una solución de nutrientes, un dispositivo de agitación que se utiliza para agitar la solución de nutrientes	Reducción en el consumo de energía, costo de producción.

Si bien el desarrollo de fotobiorreactores ha estado bajo estudio desde la década pasada, uno de los mayores retrocesos en la producción de biomasa es la falta de fotobiorreactores eficientes para mejorar la productividad de las microalgas.

Por lo tanto, se hace necesario diseñar un sistema configuración y modo de operación de un fotobiorreactor para ofrecer una mayor productividad y calidad de la biomasa generada.

1.11 Creación de conocimiento y generación de ideas

El continuo aumento en los cambios ambientales, pone exigencias a las organizaciones para un continuo conocimiento basado en la creatividad y la innovación. La organización que desee hacer frente de forma dinámica con los cambios del entorno tiene que ser uno que crea la información y el conocimiento. El papel fundamental de la creatividad en las organizaciones ha sido ampliamente

reconocido por la comunidad académica. La creatividad está asociada con la parte del proceso de innovación llamada generación de ideas. Este enfoque es compatible con la definición de creatividad como: la síntesis de nuevas ideas y conceptos, donde la innovación es la aplicación de la creatividad (Vinodh *et al.*, 2013).

Aunque las definiciones de generación de ideas, creatividad e innovación existen, el concepto de creación de conocimiento (KC) por sus siglas en inglés, es descrito como una composición de descriptores (como parte del proceso de la creatividad). La capacidad de originar idea novedosa y útil. Cuando una empresa adquiere y adopta conocimiento de otros, modifica el conocimiento para que sea adecuado (Gairín *et al.*, 2012). Por lo tanto, la creación de conocimiento no es un proceso metodológico, sino un fenómeno multi-fuente, que puede conducir a la generación de una idea. Por otra parte, KC está vinculado a la estrategia de las organizaciones, el liderazgo en términos de agilidad, se considera que es una parte crítica de la gestión del conocimiento (Brix, 2017).

La Gestión de Calidad Total (TQM) se considera que tiene un papel clave en la generación de ideas, además de la creación de conocimiento. Una cultura crítica TQM es consistente con la generación de ideas. Los programas pueden catalogarse por ser mecanicista (basándose en estadística histórica), o organicista (en base a la cultura y la gente), principalmente con elementos sociales. TQM mecanicista es similar a la solución de problemas que conduce continuas mejoras mientras que TQM organicista se enfoca a dar lugar a la reformulación y avance. Así, las organizaciones pueden utilizar TQM como base para la generación de ideas proporcionando un desarrollo, lo que conlleva a la creación de conocimiento y la generación de ideas (McAdam, 2004).

1.12 Software de Innovación Asistida por Computadora

La Innovación Asistida por Computadora CAI (por sus siglas en inglés) ha tenido avances significativos en las últimas décadas. Adicionalmente, el proceso para el desarrollo de nuevos productos (NPD) ha cambiado por completo en los últimos años en muchas empresas e industrias. En las últimas décadas los procesos para desarrollar nuevos productos han sido caóticos y de ritmo lento, y en el mejor de los casos apoyados por software estándar como programas de cálculo, hojas de cálculo o procesadores de texto. Actualmente los procesos de innovación a menudo se definen como procesos complejos con software sofisticados de soporte y múltiples factores internos y externos. La creciente oferta de software de innovación ha ayudado a introducir nuevos métodos

para el Desarrollo de Nuevos Productos, lo cual dio paso a la categoría de Innovación Asistida por Computadora.

Con el fin de lograr que el complejo proceso desde la concepción de la idea hasta la difusión en el mercado practicantes, estudiantes de diferentes disciplinas como gestión empresarial, ingeniería de sistemas y de la información trabajan para mejorar las oportunidades de éxito, la eficiencia y el tiempo de comercialización del proceso del Desarrollo de Nuevos Productos (NPD). Con nuevas o mejores herramientas, los métodos de innovación y teorías (por ejemplo TRIZ), la creación de conceptos de innovación, como los modelos de procesos o las innovaciones tecnológicas, el progreso ha mejorado las capacidades de innovación de las empresas reduciendo significativamente los tiempos y costos para la creación de los nuevos productos. En este contexto, el software y las herramientas específicas para apoyar los métodos y actividades de innovación emergieron para agilizar más el proceso de Desarrollo de Nuevos Productos y guiar a los equipos de investigación a través de la generación de información y difusión de actividades. Aunque la resultante de la etapa de invención es el desarrollo de nuevos productos, una visión general concibe sistemas CAI que integren el proceso completo de innovación integral. El objetivo final de CAI, por lo tanto, es apoyar a las empresas a través del proceso de innovación (Stefan *et al.*, 2011).

1.13 Teoría para resolver problemas de innovación

“TRIZ” proviene de un acrónimo ruso que significa Teoría para Resolver Problemas Inventivos o de Innovación. Fue desarrollado por Genrich Altshuller *et al* laboradores, quienes estudiaron cerca de 400,000 patentes tecnológicas y de éstas sacaron ciertas regularidades y patrones básicos que rigen los procesos de resolución de problemas, la creación de nuevas ideas e innovación. TRIZ fue desarrollado originalmente para problemas relacionados con la tecnología, sin embargo, su aplicación se ha visto en diversos campos (Yang, *et al.*, 2011).

TRIZ se basa en la premisa de que la evolución de la tecnología y el proceso de invención no es un proceso aleatorio, sino un proceso predecible y regido por ciertas leyes. Es una lógica analítica y una manera sistemática de pensar. Este enfoque sistemático proporciona una estructura general para la aplicación de un conjunto de herramientas y técnicas de TRIZ (Imoh M. Ilevbare *et al.*,

2013). TRIZ proporciona un enfoque sistemático para la búsqueda de soluciones a los problemas técnicos.

Esta herramienta posee una considerable ventaja sobre otros métodos aplicados a la resolución de problemas y la innovación. Métodos tales como lluvia de ideas, mapas mentales, pensamiento lateral, análisis morfológico, etc., tienen la capacidad para identificar o descubrir un problema y su causa-raíz, pero carecen de la capacidad para señalar en realidad las probables soluciones al problema. Por otro lado, TRIZ ayuda a identificar los problemas y ofrece alternativas para desarrollar soluciones que producen valor (V. V. Sushkov *et al.*, 1995).

TRIZ es el conjunto de soluciones conceptuales a los problemas técnicos. Este conjunto de soluciones son una colección de los principios de la invención, las tendencias de la evolución técnica y soluciones estándar establecidas por TRIZ. Para poder aplicar cualquiera de las herramientas de TRIZ, un problema técnico debe transformarse para poder compararlos con modelos abstractos. En su forma conceptual, el problema entonces se puede manejar con una o más soluciones. La solución conceptual identificada puede transformarse en una solución específica, lo que representa una respuesta al problema original.

Este enfoque es el principal proceso de solución de problemas basados en TRIZ. Una característica distintiva de TRIZ, que lo distingue de otros métodos de resolución de problemas convencionales (lluvia de ideas) atiende a encontrar soluciones específicas a los problemas específicos directamente (Imoh M. Ilevbare *et al.*, 2013).

1.14 Las contradicciones como un medio de resolver problemas

Un problema inventivo es un problema que contiene al menos una contradicción. Con la finalidad de comprender la naturaleza de este tipo de problemas, es necesario definir el significado de una contradicción en el contexto de la teoría TRIZ.

Altshuller decía con respecto a las invenciones y a las contradicciones lo siguiente: “desde el punto de vista de la ingeniería, una invención manifiesta siempre la superación completa o parcial de una

contradicción” (Altshuller, 1999). Esencialmente, la identificación, formalización y finalmente la supresión de una contradicción es el proceso más eficaz para crear (pero no el único).

De manera general y desde la perspectiva de TRIZ, una contradicción surge cuando en un sistema, la tentativa por mejorar un cierto parámetro ocasiona la degradación inaceptable de otro parámetro también útil y viceversa [Cortes, 2003].

Existen dos tipos esenciales de contradicciones: la contradicción técnica y la contradicción física, descritas a continuación:

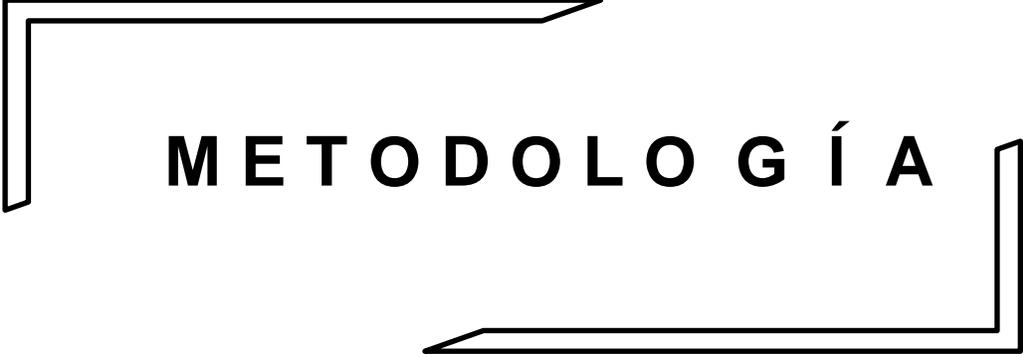
- Contradicción física

Esta contradicción exige la existencia simultánea de dos estados mutuamente exclusivos, correspondientes a una función o componente del sistema, como lo son las piezas del sistema que deben ser lisas o rugosas al mismo tiempo, frías o calientes, suave y duro, etc. Este tipo de contradicciones es resuelto utilizando los principios de separación.

Ejemplo: durante la construcción de grandes edificios, es frecuente la necesidad de insertar en el suelo pilares y barras de metal para reforzar la resistencia mecánica de una estructura. La contradicción física que se manifiesta es la siguiente: es necesario que el pilar termine en una punta para facilitar su colocación. Al mismo tiempo es necesario que el mismo pilar termine en una base más ancha que el resto del pilar para incrementar la resistencia mecánica.

- Contradicción técnica

La contradicción técnica es un tipo de contradicción donde, la mejora de un parámetro o característica útil de un sistema, provoca la degradación de otro parámetro o característica también útil y viceversa. Este tipo de contradicciones es resuelto mediante la Matriz de Resolución de Contradicciones Técnicas (MRC). Ejemplo: Durante la carga y descarga de un avión es necesaria una grúa. Sin embargo éste mecanismo aumenta el peso total del avión, lo cual demanda un motor más potente, es decir, existe una contradicción entre la necesidad de realizar una función y el peso del avión.



M E T O D O L O G Í A

CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA

En el siguiente apartado se describe la metodología que se llevó a cabo para cumplir con los objetivos de la presente investigación. En la figura 2.1 se muestra esquemáticamente las etapas metodológicas, las cuales pueden describirse de manera general en:

- 1) Obtención y caracterización de las microalgas
- 2) Determinación de la dosis recomendable de medio de cultivo Bold Basal y medio UTEX.
- 3) Definición de los niveles recomendables de las variables luminosidad y CO₂ para la obtención de pigmentos y biomasa.
- 4) Estudios de la calidad y propiedades reológicas de la biomasa obtenida al final de los tratamientos en el fotobiorreactor tubular.
- 5) Diseño, construcción y operación de un prototipo de fotobiorreactor, utilizando software de innovación asistida por computadora (CAI por sus siglas en inglés).

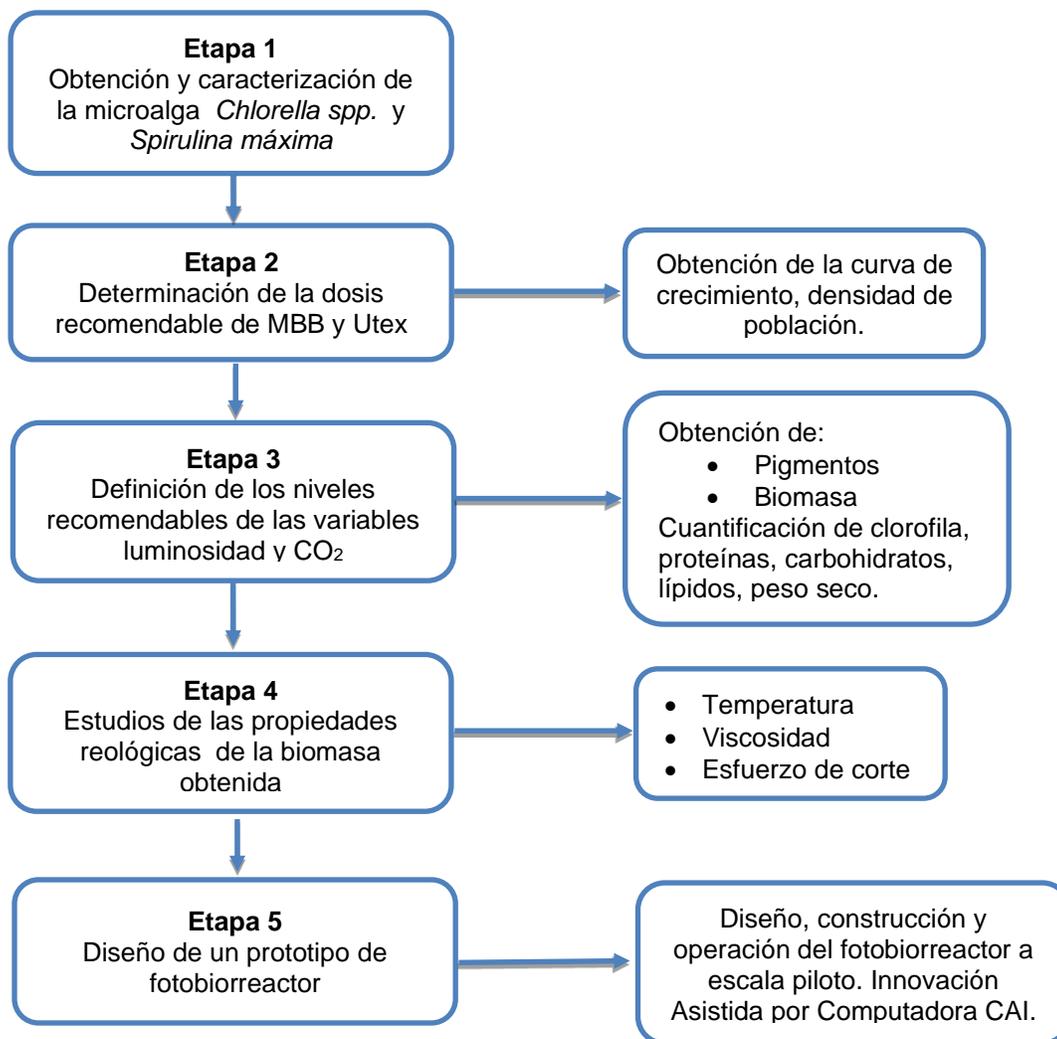


Figura 2.1 Metodología experimental

2.1 Etapa 1: Obtención y caracterización de las microalgas

La muestra de microalga de agua dulce del género *Chlorella* se obtuvo del Centro de Estudios Técnicos del Mar (C.E.T Mar 07) en Veracruz, Veracruz, donde es cultivada de manera continua en un área específica llamada cuarto húmedo, provista de aireación, temperatura controlada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, y bajo condiciones de iluminación permanente las 24 h, mediante una serie de lámparas de luz fluorescente. Debido a la importancia de ésta área, se tomaron en cuenta normas y medidas de limpieza, así como precaución en condiciones asépticas (Caballero, 2013).

La muestra de microalga de agua dulce del género *Spirulina máxima* se obtuvo de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

Durante esta etapa se adaptó la microalga a temperatura ambiente con el objetivo de mantener el cultivo en la fase exponencial de crecimiento para la posterior inoculación de los fotobiorreactores utilizados en el diseño experimental.



Figura 2.2 Adaptación de las microalgas

2.2 Etapa 2: Determinación de la dosis recomendable de MBB y Utex

Dentro de los requerimientos químicos necesarios para un buen crecimiento, se encuentra el balance entre los macronutrientes y los micronutrientes; un desbalance en la proporción suministrada de estos nutrientes, se manifiesta ya sea como un descenso en el crecimiento o hasta la detención del mismo.

Para la microalga *Chlorella spp.* se utilizó el medio de cultivo Bold Basal (MBB) y para la microalga *Spirulina máxima* el medio Utex (Domínguez, 2014).

El Medio Bold Basal está compuesto por 10 soluciones stock de diferentes compuestos (Anexo A), mientras que el medio de cultivo UTEX está compuesto por dos soluciones de metales traza (Anexo B).



Figura 2.3 Soluciones stock medio Bold Basal

Para la definición de la dosis recomendable, se realizaron cinéticas de crecimiento en matraces Erlenmeyer de 500 ml, con un volumen útil de 400 ml, los cuales se mantuvieron durante 40 días para evaluar tres dosis diferentes equidistantes (0.5, 1 y 1.5 mL/L) de medio de cultivo y un control (0 mL) para la especie *Chlorella spp.* Estas dosis fueron establecidas de acuerdo a la formulación del medio Bold Basal, tomando $\frac{1}{2}$ unidad volumétrica más y $\frac{1}{2}$ unidad volumétrica menos de lo establecido en la norma NMX-AA-087-SCFI-2010 y mostradas en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Dosis suministradas a *Chlorella spp.*

Medio Bold Basal	
Dosis	mL/L
0 (control)	0
1	0.5
2	1
3	1.5

Mientras que para *Spirulina máxima* se ocuparon dosis de 50, 100 y 150% p/v y un control (0%), como se puede apreciar en la tabla 2.2. Mediante un diseño de experimentos unifactorial con muestra y 3 réplicas, teniendo como variable de respuesta el crecimiento de la microalga medido diariamente mediante conteo directo de células en cámara de Neubauer. Durante el monitoreo de

las cinéticas se mantuvieron bajo iluminación de 4000 lux en periodos de 12 h luz/oscuridad y se evaluó el pH y producción de biomasa.

Tabla 2.2 Dosis suministradas a *Spirulina máxima*

Medio UTEX	
Dosis	%
0 (control)	0
1	50
2	100
3	150

En la dosificación de aire se utilizaron dos bombas de aire (Elite 802). La cantidad de inóculo a utilizar fue entre 3 y 10% v/v tomado de un cultivo en fase exponencial (Hernández *et al.*, 2014).

2.3 Etapa 3: Definición de los niveles recomendables de las variables luminosidad y CO₂

Para determinar los valores adecuados para la mayor producción de pigmentos fotosintéticos y biomasa en la microalga *Chlorella spp.* y *Spirulina máxima* se realizó un diseño factorial 3² con tres niveles y dos factores, los cuales se detallan en la Tabla 2.3. El tiempo de adición de CO₂ depende del flujo al cual es suministrado el gas durante dos días consecutivos y suspendiendo la adición para observar la disolución del CO₂ en el medio de cultivo y así poder evaluar su desempeño.

Tabla 2.3 Factores y niveles del diseño factorial

Factor	Nivel bajo	Nivel Medio	Nivel alto
Iluminación	2000 lux	3000	4000 lux
Concentración de CO ₂	2% (v/v)	7% (v/v)	12% (v/v)

En la Tabla 2.4 se muestran las condiciones a las que se sometió cada fotobiorreactor. Se realizó un duplicado para validar datos experimentales.

Tabla 2.4. Condiciones de operación de los fotobiorreactores

Fotobiorreactor	Factor	
	Iluminación (Lux)	Concentración de CO ₂ (% v/v)
1	2000	2
2	2000	7
3	2000	12
4	3000	2
5	3000	7
6	3000	12
7	4000	2
8	4000	7
9	4000	12

Se realizaron cinéticas de crecimiento en matraces Erlenmeyer de 500 mL con volumen útil de 400 mL durante 40 días para la evaluación de las 4 diferentes dosis de medio de cultivo. A cada matraz se le adicionó entre 3-10% de microalga y 90-97% de medio de cultivo (%v/v) con la finalidad de iniciar el cultivo con una densidad celular de 1×10^6 cel/mL.

Durante esta etapa, las condiciones de operación con respecto a la iluminación y la cantidad de CO₂, etc., serán controladas como se describe a continuación.

2.3.1 Intensidad luminosa

Se reguló por medio de un control manual de iluminación construido ex profeso para ajustar la intensidad luminosa. La lectura se realizó con un medidor digital de luminosidad Steren (modelo HER-410).



Figura 2.4 Medidor de intensidad luminosa (Luxómetro)

2.3.2 pH

Las lecturas diarias del pH se realizaron con un potenciómetro Orion (modelo 250-A), con el fin de mantener el cultivo de la microalga dentro de los límites tolerables (fig. 2.5).



Figura 2.5 Potenciómetro

2.3.3 Alcalinidad total

Se define a la alcalinidad como la capacidad del agua para neutralizar ácidos o aceptar protones. Esta representa la suma de las bases que pueden ser tituladas en una muestra. Dado que la alcalinidad está determinada generalmente por el contenido de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, ésta se toma como un indicador de dichas especies iónicas.

Esta determinación se realizó mediante la técnica utilizada en la NOM-041-SSA1-1993, que consiste en llevar a cabo la titulación de la muestra con un potenciómetro hasta alcanzar un pH de 4.6.

El cálculo se realizó a través de la ecuación 2.1:

$$\text{Alcalinidad (mg de } \frac{\text{CaCO}_3}{\text{L}}) = \frac{A \times B \times 50\,000}{\text{mL de la muestra}} \quad (2.1)$$

En donde:

A = mL de ácido gastado

B = normalidad del ácido

2.3.4 Densidad celular

Se determinó mediante la cámara de Neubauer o hematocitómetro (fig. 2.6), el volumen que hay entre el portaobjetos y el cubreobjetos en la cuadrícula, es una diezmilésima de mililitro, el cálculo se expresa en células/mL. Cuando el cultivo estaba muy concentrado, se realizaron diluciones (1:2, 1:5, 1:10, etc. según fue necesario) para facilitar el conteo.

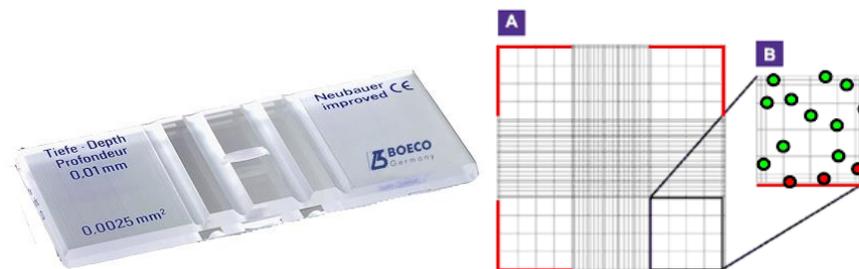


Figura 2.6 Cámara de Neubauer

2.3.5 Biomasa por peso seco

La biomasa se cuantificó por método gravimétrico, se filtraron 10 mL de cultivo, a través de un filtro Whatmann GF/C de 1.2 μm de tamaño de poro, con una presión de vacío no mayor de 15 mm Hg, previamente llevado a peso constante. El filtro junto con la muestra se secó por un periodo de 6-8 horas en una estufa con una temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$, posteriormente se colocó en un desecador durante 1 hora y se pesó nuevamente en balanza analítica. El peso seco de la muestra se determinó por diferencia de peso mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Peso seco } \left(\frac{g}{L}\right) = (\text{PFM} - \text{PF}) * R \quad (2.2)$$

En donde:

PFM = Peso seco del filtro más la microalga

PF = Peso seco del filtro

R= La razón L/mL filtrados (1000/ x ml)

2.3.6 Contenido de carbohidratos

La determinación del contenido de carbohidratos, se realizó por el método de fenol-sulfúrico utilizado universalmente (Dubois *et al.*, 1956) y se tomó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Genesis 20. La muestra de 1 mL de microalga para la reacción de fenol con los glucósidos (azúcares y sus metil derivados, oligosacáridos y polisacáridos solubles), en presencia de ácido sulfúrico concentrado. El color es amarillo-naranja ó rosado y es proporcional a la concentración. Las concentraciones se calcularon mediante una curva estándar realizada con glucosa.



Figura 2.7 Espectrofotómetro

2.3.7 Lípidos

Los lípidos son moléculas compuestas principalmente de carbono e hidrógeno aunque también pueden contener oxígeno, nitrógeno, azufre, etc. Debido a su composición son hidrófobas, por lo que su extracción se lleva a cabo empleando solventes orgánicos como cloroformo, hexano, etc. La determinación de lípidos se llevó a cabo por el método de extracción Soxhlet; la muestra fue separada por filtración y extraída con un solvente en equipo Soxhlet, posteriormente se evaporó el solvente y se cuantificó gravimétricamente el material (Official Methods of Analysis A.O.A.C. 15th Edition, U.S.A. 1990).



Figura 2.8 Sistema de extracción Soxhlet

2.3.8 Proteínas totales

La determinación de proteínas se realizó 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 (NOM4500-norg-B-SM).



Figura 2.9 Equipo Kjendahl

2.3.9 Determinación de pigmentos

La determinación de clorofilas tipo a y b que son características de la microalga *Chlorella spp.* y *Spirulina máxima* se realizó por medio del método utilizado universalmente de Jeffrey y Humprey, (1975) extrayendo los pigmentos mediante un solvente orgánico. Las absorbancias se leyeron a longitudes de onda de 445 nm y 660 nm.

2.3.10 Tasa de crecimiento celular

Con los valores obtenidos de densidad celular en los cultivos, se determinó la velocidad o tasa de crecimiento celular μ (Band, 1997) con la Ecuación 2.3.

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0} \quad (2.3)$$

Donde:

μ es la velocidad o tasa de crecimiento.

X_1 es la densidad celular al tiempo t.

X_0 es la densidad celular al tiempo inicial t_0 .

2.3.11 Tasa de fijación de CO₂

La tasa de fijación de CO₂ (P_{CO_2}) se evaluó como la relación entre el contenido de carbono en las células y la productividad de biomasa de las microalgas (Jacob-López *et al.*, 2009) de acuerdo con la ecuación 2.4.

$$P_{CO_2} = C_c P_{\max} \left(\frac{M_{CO_2}}{M_C} \right) \quad (2.4)$$

Donde

C_c es la cantidad de carbono en las células de *Chlorella spp.*

M_{CO_2} es el peso molecular del CO₂

M_C es el peso molecular del carbono

P_{\max} es la productividad de la biomasa

2.4 Etapa 4: Estudios de la calidad y propiedades reológicas de la biomasa obtenida

La determinación de las propiedades reológicas es un aspecto importante en su caracterización química, ya que nos proporciona una amplia información del tipo de flujo que presenta el cual nos ayuda a entender mejor sus propiedades.

Se realizaron estudios de la calidad y propiedades reológicas de la biomasa obtenida durante el proceso, tales como la viscosidad, temperatura, esfuerzo de corte, etc. En esta etapa se utilizó un reómetro Anton Paar modelo MCR 301 (fig. 2.10), con plato peltier para el control de temperatura y una geometría de 4 palas rectas o geometría "Vane".

Para el análisis reológico se tomaron muestras de 40 ml diariamente durante todo el cultivo de la microalga. La temperatura de las muestras fue acondicionada a temperatura ambiente (25°C) utilizando el peltier del equipo con la finalidad de reproducir las condiciones del proceso durante el cultivo y una velocidad de corte en el reómetro entre 2 y 1000 s⁻¹.

Antes de realizar las mediciones, el equipo fue calibrado utilizando el método de calibración rápida proporcionada por el equipo y una vez al mes se hizo una calibración larga con la finalidad de mantener las mismas condiciones de medición en cada muestra.

La medición y captura de los datos obtenidos se realizó utilizando las rutinas de análisis del software Rheoplus /32 V2.81 con el que se opera el reómetro.



Figura 2.10 Reómetro Anton Paar

2.5 Etapa 5: Diseño de un fotobiorreactor 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 2.5 tomando como límite superior del rango 0.6 con el fin de obtener el valor máximo de dicho diámetro.

$$D_r = [0.3 \text{ a } 0.6]D_d \quad (2.5)$$

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

$$H = [3 \text{ a } 6]D_d \quad (2.6)$$

Para el volumen total del downcomer (V_{Td}) dado en la ecuación 2.7 esta expresada en función de diámetro donde se tiene en cuenta el volumen de un cilindro y se expresa en función del área ($A_{base} = \frac{\pi}{4} D_d^2$) y la altura (H), obteniendo la siguiente ecuación:

$$V_{Td} = \frac{\pi H D_d^2}{4} \quad (2.7)$$

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 2.8. Para este caso V_T es cero ya que no cambia su volumen interno.

$$V_T = V_{Td} - V_t \quad (2.8)$$

Para el cálculo del volumen de operación (V_{op}) se calcula mediante la ecuación 2.9, tomando un valor intermedio de los valores de 0.8.

$$V_{op} \approx [0.7 \text{ a } 0.9] V_T \quad (2.9)$$

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 realizarán los diseños en Edraw Max 7.9.

2.5.1 Montaje del fotobiorreactor airlift a escala piloto

En esta etapa se realizó la puesta en marcha de cada una de las partes diseñadas. Las partes importantes que se revisaron fueron:

- El material y construcción del fotobiorreactor.

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

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.

- 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. Una vez adquiridas se realizarán pruebas hidráulicas para ver si no existen 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 CO₂

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 CO₂ se revisó el flujo en mL/min adecuándolo a las condiciones establecidas, así mismo las válvulas check y conexiones que este mismo necesita.

2.5.2 Operación del fotobiorreactor airlift a escala piloto

En esta etapa se realizó la implementación en el fotobiorreactor a escala piloto de los mejores niveles de nutrientes, intensidad luminosa y suministro de CO₂ obtenidos en las etapas previas

teniendo como variable de respuesta el crecimiento celular. Para evaluar la calidad de la biomasa obtenida al finalizar la operación y monitoreo del fotobiorreactor a escala piloto, se realizó la caracterización correspondiente (carbohidratos, lípidos y proteínas) mediante las técnicas descritas anteriormente.

2.6 Resolución de contradicciones

Dentro de la teoría TRIZ, existe una herramienta para guiar la búsqueda de problemas análogos o estándar y de las soluciones estándar utilizadas. Este enfoque es la base de una de las herramientas más populares de TRIZ: la matriz de resolución de contradicciones técnicas (MRCT) que relaciona los 40 Principios de Resolución de contradicciones y los 39 parámetros genéricos, esta relación fue dispuesta en una matriz de 39*39. La matriz actual reposa sobre el análisis de más de 2.5 millones de patentes (Altshuller, 2005), (Savransky, 2000).

El problema a resolver en el presente trabajo se trata de un fotobiorreactor tipo airlift utilizado para el cultivo de microalgas con el objetivo de obtener biomasa rica en nutrientes y pigmentos.

Proceso de resolución:

- 1) Se identificaron las contradicciones presentes en el fotobiorreactor.
- 2) Se identificaron los parámetros correspondientes a cada contradicción (parámetro a mejorar parámetro que se degrada).
- 3) Se utilizó la matriz de resolución de contradicciones para obtener los principios de solución.
- 4) Se proponen soluciones basadas en cada principio o la combinación de estos.



RESULTADOS

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El capítulo tres describe los resultados obtenidos en las etapas experimentales para el cumplimiento de los objetivos generales y particulares con la finalidad de obtener los mejores tratamientos que ofrezcan el mayor contenido de pigmentos y biomasa en cada una de las especies de microalgas estudiadas.

3.1 Obtención y adaptación de las microalgas

La muestra de microalga de agua dulce del género *Chlorella spp.* y *Spirulina máxima* fueron adaptadas dentro de las instalaciones del Laboratorio Ambiental II del Tecnológico Nacional de México campus Orizaba.

En las figuras 3.1a y 3.1b se muestra la obtención de cada una de las microalgas.

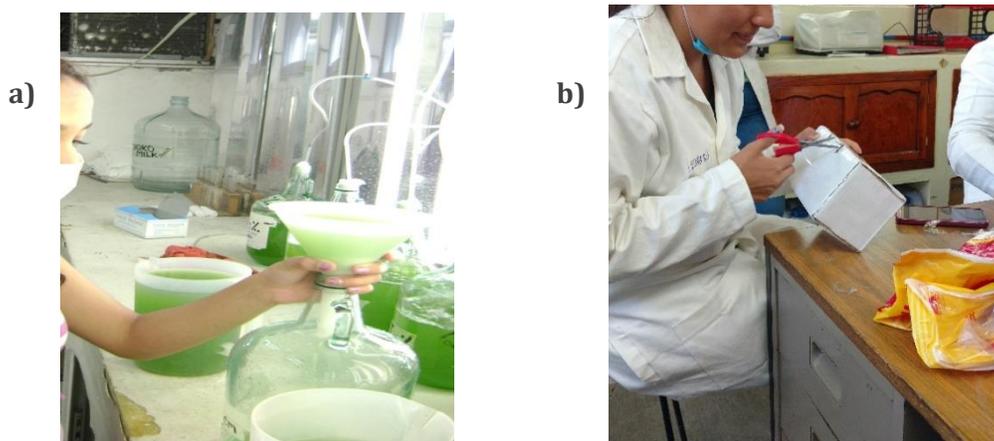


Figura 3.1 Obtención de la especie: **a)** *Chlorella spp.* y **b)** *Spirulina máxima*

Las muestras de microalgas se adaptaron a temperatura ambiente con el objetivo de mantener el cultivo en las condiciones de trabajo. Una vez adaptadas se mantuvieron los cultivos en la fase exponencial de crecimiento para la inoculación de los fotobiorreactores.

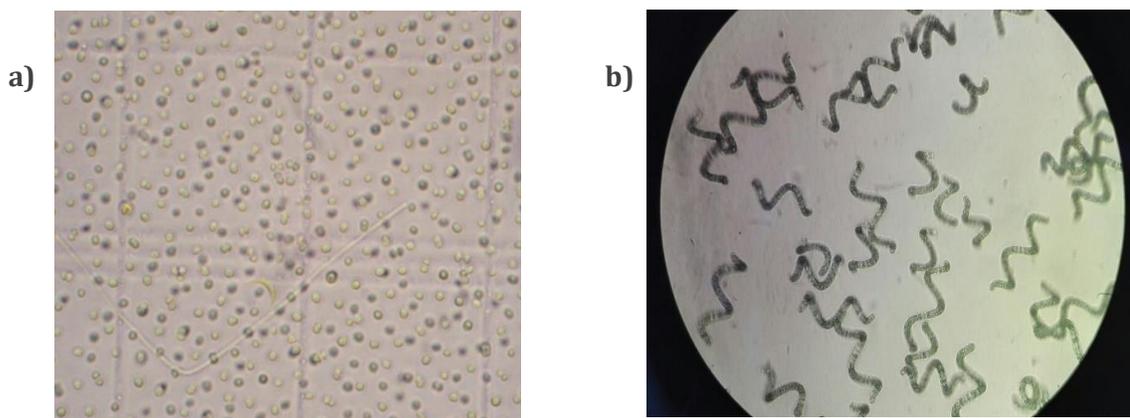


Figura 3.2 a) Microalga *Chlorella spp.*

b) Microalga *Spirulina máxima*

Las figuras 3.2a muestra la microalga *Chlorella spp.* y 3.2b la microalga *Spirulina máxima* cada una vistas en microscopio con un objetivo de lente 40X. Se puede observar la especie *Chlorella spp.* unicelular color verde de forma esférica y tamaño entre 5 y 20 μm , mientras que *Spirulina máxima* presenta forma de espiral y puede llegar a medir hasta 40 μm de longitud.

3.2 Medios y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se realizó la preparación del medio de cultivo Bold Basal (MBB) para la especie *Chlorella spp.*, y medio UTEX para la especie *Spirulina máxima* que, mediante la determinación de la dosis recomendable, puede o no sufrir algunas modificaciones. La composición específica del medio de cultivo utilizado, así como la preparación de éste, se encuentran en los Anexos A y B del presente trabajo.

Las condiciones de cultivo mantenidas en cada uno de los fotobiorreactores se especificaron en la tabla 2.2 y bajo iluminación por fotoperiodos de 4000 lux de 12:12 luz:oscuridad mediante 2 lámparas fluorescentes de luz fría de 20 Watts cada una, a temperatura ambiente, y con sistema de aireación constante mediante burbujeo, esto con el objetivo de que las microalgas no se sedimenten y la luz pueda penetrar de forma uniforme al cultivo.

3.3 Determinación de la dosis recomendable MBB para *Chlorella spp.*

En la figura 3.3 se observa el crecimiento celular de *Chlorella spp.*, obtenido para cada una de las dosis, se observa que existen diferencias significativas en términos de crecimiento de la microalga expresado en número de células por mililitro, obteniéndose un punto máximo crecimiento de 7.26×10^7 al día 15 con la dosis de 1.5 mL/L de medio de cultivo, siendo esta la dosis recomendable demostrando que favorece el crecimiento microalgal, mientras que para las dosis de 0, 0.5 y 1 mL fueron de 2.16×10^7 , 4.6×10^7 , y 5.63×10^7 cel/mL respectivamente, éstos se obtuvieron al día 8 para la dosis control, al día 15 para la dosis de 0.5 y al día 19 para la dosis de 1 mL/L de medio de cultivo.

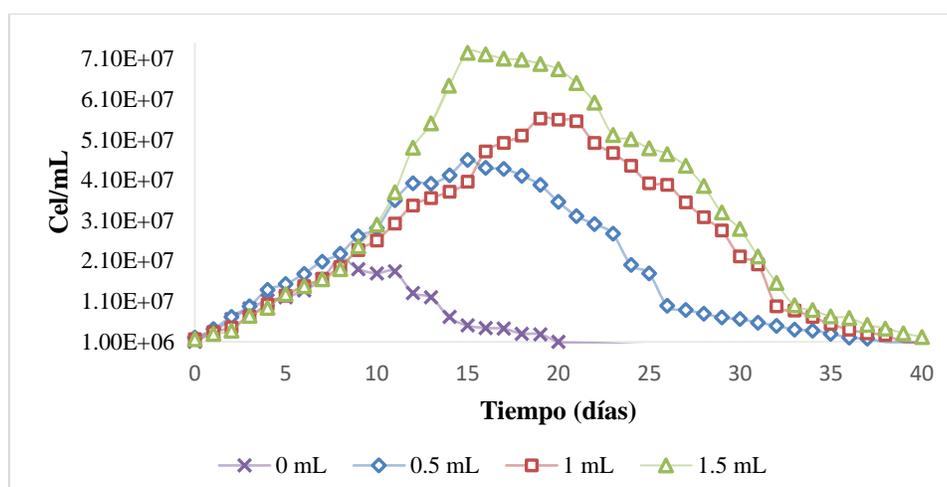


Figura 3.3 Cinéticas de crecimiento de *Chlorella spp.* a diferentes dosis de MBB

Se llevó a cabo un análisis de varianza y una prueba de Fisher, 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.

La tabla 3.1 muestra los resultados obtenidos en el análisis de varianza, empleando el crecimiento celular como variable de respuesta, el valor de alpha ofrece el intervalo de confianza para aceptar la hipótesis alterna la cual demostró que la dosis de Medio Bold Basal aplicada en el cultivo influye significativamente en el crecimiento de la microalga *Chlorella spp.*

Tabla 3.1 ANOVA para las cinéticas de diferentes dosis de MBB

Término	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Prueba F	Prob. nivel	Alpha=0.05
A:Nutrientes (mL/L)	3	44.465	14.821	95.35	0.000001*	1.00000
S(A)	8	1.2435	0.1554			
Total (Ajustado)	11	45.709				
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 Fisher, en la cual se aprecia que el control (dosis 0) 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 Fisher para las cinéticas de diferentes de dosis MBB

Grupo	Orden	Media	Diferencia entre grupos
0	3	0.55033	1, 0.5, 1.5
1	3	4.1806	0, 1.5
0.5	3	4.4533	0, 1.5
1.5	3	5.7263	0, 1, 0.5

3.3.1 Comportamiento de pH en *Chlorella spp.*

Con respecto al pH, un estudio previo (González, 2015) reportó valores entre 6.15-8.24, Li-Hai Fan (2008) obtuvo valores de pH de 7.02 a 8.25 alcanzados en un fotobiorreactor operado con la

microalga *Chlorella vulgaris*, mientras que un estudio realizado por Morris reportó valores entre 6.15-8.24, en el presente estudio el pH mínimo fue 7.35 en la dosis de 1 mL/L y el máximo de 10.03 obtenido en la dosis 0.5 ml/L, valores que están cercanos del rango reportado por los autores mencionados anteriormente y dentro de la tolerancia de la especie de microalga.

En la Figura 3.4 se observa el comportamiento del pH durante las cinéticas de crecimiento. El rango de pH para las dosis aplicadas se encuentra ente 7.35 y 10.03, sin embargo, se aprecia un pH más estable en la dosis de 1.5 mL, esto se debe a que ésta dosis cumple con los requerimientos de nutrientes y vitaminas de la microalga, proporcionándole un mayor equilibrio para realizar su ciclo de reproducción celular (Farrelly *et al.*, 2013).

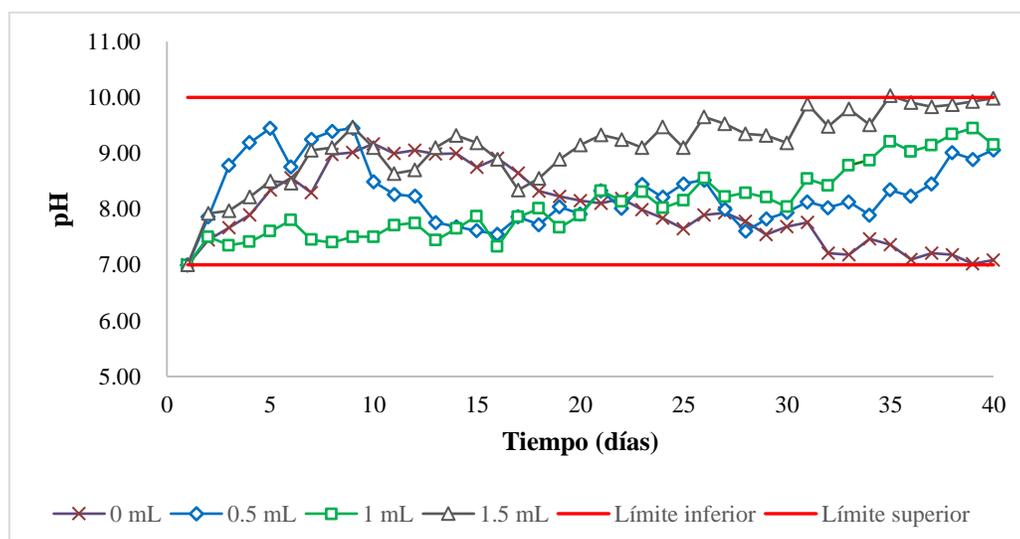


Figura 3.4 Comportamiento de pH en *Chlorella spp.* a diferentes dosis de MBB

En la tabla 3.3 se presentan los resultados de pH obtenidos durante las cinéticas de crecimiento de la microalga, de acuerdo a las dosis aplicadas al cultivo.

Tabla 3.3 Comportamiento de pH durante las cinéticas

Dosis (mL/L)	pH			
	Mínimo	Máximo	Promedio	Desv std
0	7.45	9.17	8.01	0.676
0.5	7.55	9.45	8.29	0.582
1	7.35	9.45	8.10	0.636
1.5	7.92	10.03	9.13	0.699

3.3.2 Curva de calibración *Chlorella spp.*

El crecimiento se puede considerar como el aumento sincronizado de todos los constituyentes químicos de un organismo, lo cual, para los organismos unicelulares conduce a un aumento en el número de individuos en la población.

Los modelos cinéticos pueden ser usados para describir la relación entre las principales variables y para explicar el comportamiento del crecimiento. Cuando el cultivo se encontró en su máximo punto de crecimiento, se tomó una muestra de microalga y se llevaron a cabo 10 diluciones con la finalidad de obtener la curva de calibración de la especie *Chlorella spp.* A los datos obtenidos se les realizó un análisis de regresión polinomial de segundo orden para obtener la ecuación de la recta, esta información (ecuaciones) se pueden utilizar para conocer y analizar la concentración en cel/mL del cultivo, utilizando la lectura de absorbancia como la variable independiente.

En la figura 3.5 se observa la curva de calibración tomando en cuenta la absorbancia respecto al crecimiento; y ajustada a un modelo de segundo orden con una $R^2=0.985$ de acuerdo al modelo $y = -1e+08x^2 + 2e+08x - 2e+06$, estas mediciones se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos durante la etapa de adaptación, nos indican que se obtuvo una buena adaptación del cultivo a las condiciones ambientales y al medio de cultivo MBB.

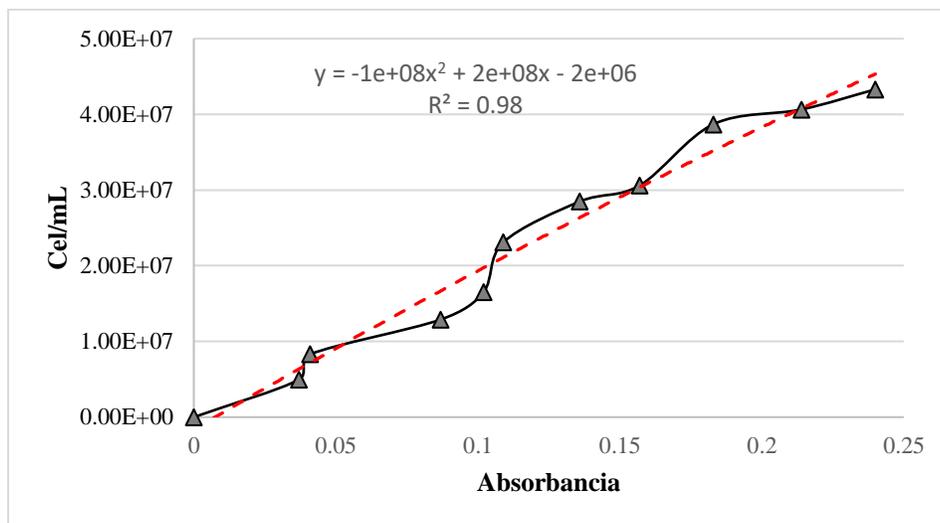


Figura 3.5 Curva de calibración de la microalga *Chlorella* spp.

El modelo anterior explica el 98.5% de los datos obtenidos durante la curva de crecimiento, con esto se puede predecir el comportamiento del cultivo, y teniendo el valor de la absorbancia con longitud de onda de 750 nm se puede conocer de manera rápida y confiable la densidad celular.

3.4 Determinación de la dosis recomendable UTEX para *Spirulina máxima*

En la figura 3.6 se observa el crecimiento celular de *Spirulina máxima*, obtenido para cada una de las dosis, se observa que existen diferencias significativas en términos de crecimiento de la microalga expresado en número de células por mililitro, obteniéndose un punto máximo crecimiento de 1.81×10^6 al día 25 con la dosis de 150% de medio de cultivo, siendo esta la dosis recomendable demostrando que favorece el crecimiento de las microalgas, mientras que para las dosis de 0, 50 y 100% el crecimiento fue de 2.15×10^2 , 9.05×10^5 , y 1.59×10^6 cel/mL respectivamente, éstos se obtuvieron al día 6 para la dosis control, al día 26 para la dosis de 50% y al día 30 para la dosis de 100% de medio UTEX.

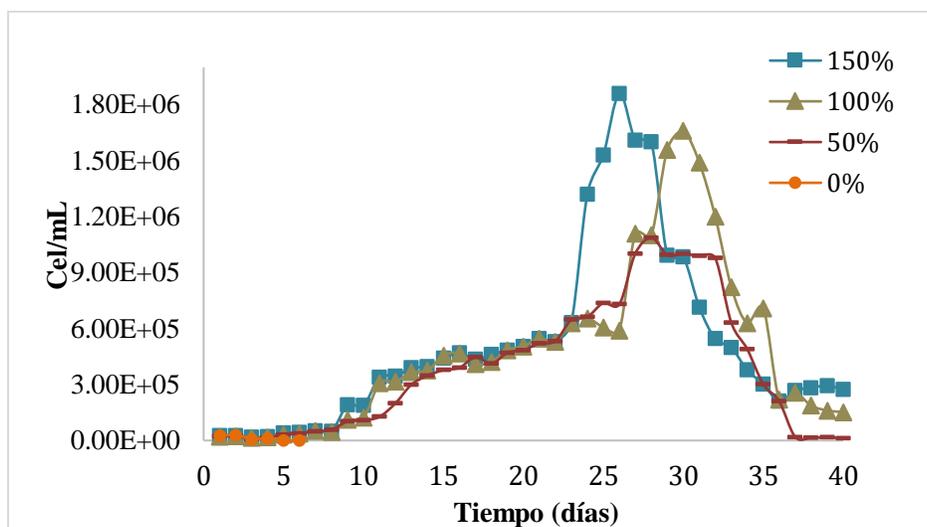


Figura 3.6 Cinéticas de crecimiento de *Spirulina máxima* a diferentes dosis de medio Utex

Se llevó a cabo un análisis de varianza y una prueba de Fisher, 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.

La tabla 3.4 muestra los resultados obtenidos en el análisis de varianza, el cual demostró que la dosis de Medio UTEX aplicada en el cultivo de la microalga, influye significativamente en el crecimiento de la microalga *Spirulina máxima*, el valor de alpha brinda los elementos estadísticos necesarios para aceptar la hipótesis alterna y rechazar la hipótesis nula (la dosis de nutrientes no influye significativamente sobre el crecimiento de la microalga).

Tabla 3.4 ANOVA para las cinéticas de diferentes dosis de medio UTEX

Término	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Prueba F	Prob. nivel	Alpha= 0.05
A:Nutrientes (%)	2	6.56e+11	3.28e+11	30.35	0.000728*	0.9996
S(A)	6	6.48e+10	1.08e+10			
Total (Ajustado)	8	7.21e+11				
Total	9					

*Término significativo de alpha=0.05

Por otra parte, en la tabla 3.5 se observan los resultados obtenidos en la prueba de Fisher, en la cual se aprecia que el control (dosis 0) resulta ser significativamente diferente a las demás dosis, con una media de 5.7×10^6 cel/mL debido al poco crecimiento de la microalga, y muy por debajo de las medias obtenidas en el resto de las cinéticas. La dosis 100 y 150% no presentan diferencia significativa entre ellas, sin embargo, la dosis 150% obtuvo la mayor media estadística con respecto al crecimiento de la microalga, por lo cual se optó por utilizar ésta relación medio UTEX.

Tabla 3.5 Prueba de Fisher para las cinéticas de diferentes dosis de medio UTEX

Grupo	Orden	Media	Diferencia entre grupos
0	3	5778943	50, 100, 150
50	3	1066667	100, 150
100	3	1570000	50, 0
150	3	1690000	50, 0

3.4.1 Comportamiento de pH en *Spirulina máxima*

Silva *et al.*, (2010) demostraron que la especie *Spirulina* es capaz de crecer en un rango de pH entre 8-11. Un estudio previo realizado por Domínguez (2015) reportó valores de pH entre 9.15 a 10.12 alcanzados en un fotobiorreactor operado con la microalga *Spirulina máxima*, mientras que Vásquez *et al.*, (2014) reportaron valores de pH entre 8.0 10.0. En el presente estudio el pH mínimo fue 8.0 en la dosis de 100% y el máximo de 10.65 obtenido en la dosis 150%, valores que están cercanos del rango reportado por los autores mencionados anteriormente y dentro de la tolerancia de la especie de microalga.

En la figura 3.7 se observa el comportamiento del pH durante las cinéticas de crecimiento. El rango de pH para las dosis aplicadas se encuentra ente 8-11, dentro de los límites mínimos y máximos tolerables por esta especie.

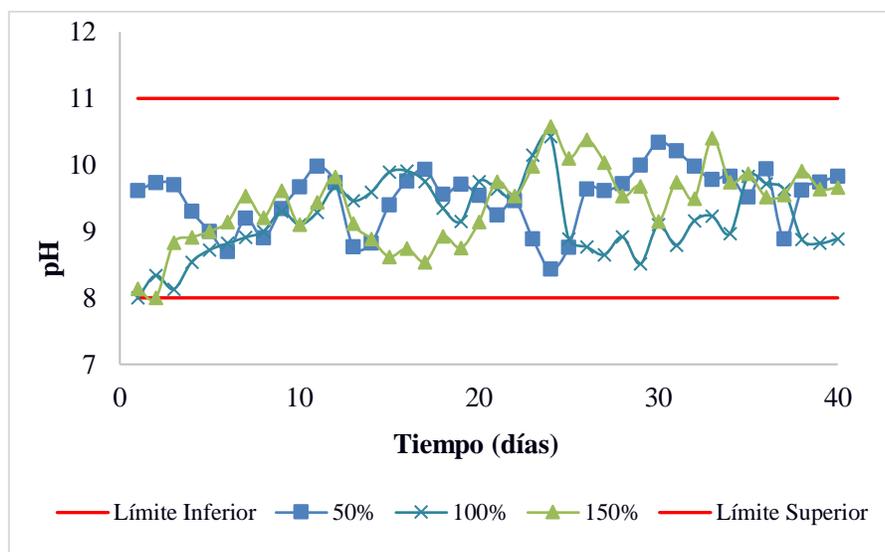


Figura 3.7 Comportamiento de pH en *Spirulina máxima* a diferentes dosis de medio UTEX

En la tabla 3.6 se presentan los valores de pH obtenidos durante las cinéticas de crecimiento de la microalga, de acuerdo a las dosis aplicadas al cultivo.

Tabla 3.6 Comportamiento del pH durante las cinéticas de *Spirulina máxima*

Dosis %	pH			
	Mínimo	Máximo	Promedio	Desv std
50	8.43	10.34	9.49	0.452
100	8.0	10.43	9.18	0.545
150	8.0	10.58	9.39	0.584

3.5 Definición de los niveles recomendables de luminosidad y CO₂

Para confirmar la importancia del suministro de CO₂ y luminosidad sobre el crecimiento de las microalgas y sus propiedades fisicoquímicas, se realizó el cultivo de las microalgas durante 30 días en fotobiorreactores a escala laboratorio sometidos a las condiciones establecidas en la tabla 2.4.

3.5.1 Diseño experimental 3² para *Chlorella spp.*

Debido a que casi el 50% de la biomasa de microalgas se compone de carbono, este elemento constituye el principal macronutriente para el crecimiento y productividad de las microalgas y cianobacterias. El dióxido de carbono es la fuente del carbono en el crecimiento de células fotoautotróficas. Incluso cuando una intensa mezcla del cultivo es proporcionada, la simple difusión del CO₂ del aire (0.03% CO₂) en el agua, es demasiado lenta para remplazar el CO₂ asimilado por las algas que crecen rápidamente. La inducción de CO₂ a los fotobiorreactores, debe ser considerada dentro del diseño, proveer este gas a las microalgas y cianobacterias ayuda a desoxigenar el medio y evitar la fotooxidación (Benavente-Valdés *et al.*, 2012). Por lo tanto, los cultivos de algas en fotobiorreactores son generalmente limitados por CO₂ y el CO₂ adicional debe ser suministrado en el medio para asegurar el satisfactorio crecimiento (Chioccioli *et al.*, 2014). De acuerdo al diseño experimental planteado, se monitorearon los 9 fotobiorreactores a escala laboratorio de acuerdo a los siguientes parámetros.

3.5.2 Densidad celular

La figura 3.8 muestra los resultados del diseño experimental 3² (explicado en la sección 3.5) con respecto al crecimiento celular de las diferentes cinéticas, los fotobiorreactores 1, 2 y 3 bajo las condiciones de 2000 lux y 2%, 7% y 12% CO₂ respectivamente tuvieron crecimiento celular similar a los fotobiorreactores 4, 5 y 6 bajo las condiciones de 3000 lux y 2%, 7% y 12% CO₂. los fotobiorreactores 7, 8 y 9 con una intensidad luminosa de 4000 Lux tuvieron el mejor crecimiento celular con respecto a las demás, de los cuales el Matraz 7 (en condiciones de 4000 Lux y suministro de CO₂ 2% v/v) tuvo el mejor crecimiento con 5.8x10⁷ cel/mL al final del proceso.

Se ha reportado un aumento en la productividad de la biomasa y en las tasas de absorción de CO₂ al aumentar la intensidad de la luz. De hecho, la tasa fotosintética es directamente proporcional a la intensidad luminosa, lo que resulta en un aumento de la productividad de la biomasa y en la absorción de CO₂ (Goncalves *et al.*, 2014). Esto se puede observar en la Figura 3.8, donde los resultados muestran que se obtuvo un mayor crecimiento (6.3 x10⁷ cel/mL) en el FBR 7 bajo 4000 lux que el crecimiento observado bajo 2000 y 3000 lux (3.9 x10⁷ y 3.6x10⁷ cel/mL) que se obtuvo en los FBR's 2 y 6, respectivamente.

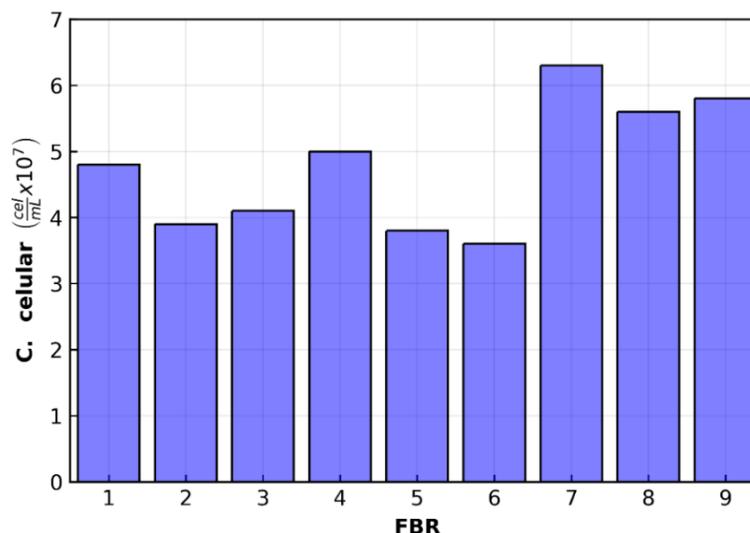


Figura 3.8 Crecimiento celular de *Chlorella* spp. a diferentes condiciones de luminosidad y CO₂

Se llevó a cabo un análisis de varianza y una prueba de Fisher, 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.

La tabla 3.7 muestra los resultados obtenidos en el análisis de varianza, empleando el crecimiento celular como variable de respuesta (Montgomery, 2014), demostró que la intensidad luminosa aplicada en el cultivo de la microalga, influye significativamente en el crecimiento de la microalga *Chlorella* spp.

Tabla 3.7 ANOVA del crecimiento celular a diferentes condiciones de luminosidad y CO₂

Término	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Prueba F	Prob. nivel	Alpha=0.05
A:CO ₂ (v/v)	2	1.4228	0.71143	5.25	0.0760	0.4876
B:Luminosidad (lux)	2	3.4588	1.7294	12.77	0.0183*	0.8462
S	4	0.5418	0.13546			
Total (Ajustado)	8	5.4236				
Total	9					

*Término significativo de alpha=0.05

Comparando la prueba de Fisher, el valor estadístico F de tablas para el CO₂ fue 6.94 y el valor crítico F calculado fue 5.25. Se observa que hay una diferencia mínima entre ambos valores; la estadística F para la intensidad luminosa fue de 6.94 y la F calculada fue de 12.77, destacando una mayor diferencia sobre la intensidad de la luz. Por lo tanto, hay un mayor nivel de significancia que la intensidad luminosa beneficiará o afectará el crecimiento de la microalga.

El comportamiento en el presente estudio es comparable con los resultados encontrados por Gong *et al.*, (2014) quienes indicaron el efecto de la intensidad luminosa sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris* mostraron que, en términos de intensidad luminosa, la densidad celular fue mayor en 3960 lux. En este estudio, la densidad celular más alta fue bajo luminosidad de 4000 lux. Ota *et al.* (2015) reportaron resultados similares con la microalga *Chlorococcum littorale* y demostraron que la intensidad de la luz afectó el crecimiento celular y se explicó en un modelo matemático.

De acuerdo con Li *et al.*, (2010) la productividad de microalgas al 2% de CO₂ fue mayor que la de 8% de CO₂ utilizando microalga *Chlorella vulgaris*, concluyeron que la baja productividad de microalgas del 8% de CO₂ se debía a que el exceso de CO₂ disuelto inhibía el crecimiento de las microalgas. En este estudio, la densidad celular más alta fue con suministro de 2% de CO₂. La mayor densidad celular observada en los FBR 7, 8 y 9 (fig. 3.8) puede obtenerse manteniendo una intensidad de luz adecuada (4000 lux). Además, considerando que hubo un mayor crecimiento en FBR 7 y en base a la discusión anterior, el fotobiorreactor debe operarse a 4000 lux con suministro de CO₂ al 2% v/v para obtener la mayor concentración de crecimiento celular. Lo que conduce a una mayor capacidad de eliminación de CO₂.

Por otra parte, en las tablas 3.8 y 3.9 se observan los resultados obtenidos en la prueba de Fisher, para el término del suministro de dióxido, el cual no resultó ser significativo para la variable de respuesta. Para el término de luminosidad, las intensidades de 2000 y 3000 lux, sólo presentan diferencia significativa con 4000 lux, sin embargo, la intensidad de 4000 lux obtuvo la mayor media estadística con respecto al crecimiento de la microalga, por lo cual se optó por utilizar esta intensidad luminosa.

Tabla 3.8 Prueba de Fisher crecimiento celular: término luminosidad.

Término A: Dióxido Respuesta: Crecimiento celular

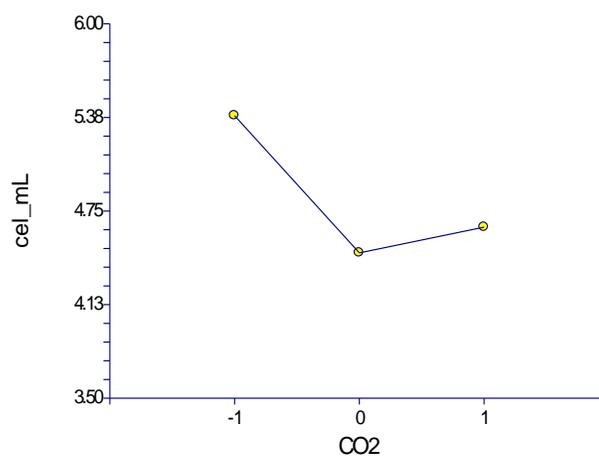
Grupo	Orden	Media	Diferencia entre grupos
2%	3	4.47	
7%	3	4.643	
12%	3	5.387	

Tabla 3.9 Prueba de Fisher crecimiento celular: término CO₂

Término B: Luminosidad Respuesta: Crecimiento celular

Grupo	Orden	Media	Diferencia entre grupos
2000	3	4.387	4000
3000	3	4.403	4000
4000	3	5.71	2000, 3000

Los efectos de interacción se muestran en las figuras 3.9, 3.10, y 3.11. Se observó que para el caso de la interacción "CO₂-Crecimiento" se evaluó que el efecto de la variable de respuesta es mayor cuando el suministro es de 2%. En la interacción "Iluminación-Crecimiento" se observó que el crecimiento de la microalga aumentó con la iluminación a 4000 lux.

**Figura 3.9** Gráfico de interacción "CO₂-Crecimiento"

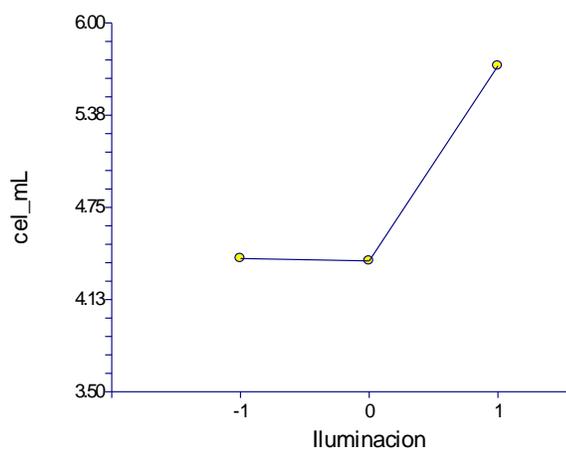


Figura 3.10 Gráfico de interacción “Iluminación-Crecimiento”

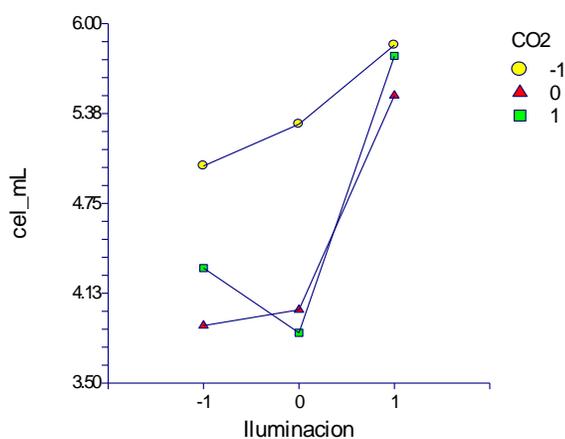


Figura 3.11 Gráfico de interacciones “CO₂- Iluminación-Crecimiento”

Con este resultado y de acuerdo a las figuras anteriores se puede deducir que si se desea obtener altas concentraciones de biomasa y crecimiento celular, se recomienda utilizar las condiciones de 4000 Lux y suministro de CO₂ al 2% v/v.

3.5.3 pH

Los valores de pH se monitorearon durante el proceso del suministro de CO₂ e iluminación. Khalil *et al.*, (2010) demostró que *Chlorella* puede crecer en un amplio rango de pH (4-10) y el

rendimiento máximo de biomasa se obtuvo en condiciones alcalinas (pH a 9 y 10). Como se muestra en las figuras 3.12 y 3.13, con una intensidad luminosa de 2000 y 3000 lux, el rango de pH obtenido en los FBR's 1-3 y 4-6, respectivamente, fluctuó de 7.0 a 9.5, mientras que el pH bajo intensidad luminosa de 4000 lux (fig. 3.14) fluctuó de 8.0 a 10.0 (condiciones alcalinas) y bajo estas condiciones se alcanzó el mayor crecimiento. Los niveles alcalinos del medio son producto del metabolismo de las microalgas y es mayor con un pH controlado a 10.0 (Walker, 2002). Esta puede ser la principal razón de la mayor densidad celular alcanzada en el FBR 7.

El suministro de CO₂ durante el cultivo de microalgas es un proceso determinante en el desarrollo eficiente de microorganismos porque contribuye al proceso fotosintético y controla el pH del cultivo. El pH aumenta debido al consumo de CO₂, cuando el CO₂ se disuelve en el agua, tres tipos de carbono inorgánico están presentes en la fase acuosa: CO₂ (aq), bicarbonato e iones de carbonato. El pH del cultivo también aumenta y puede retener el contenido de carbono inorgánico en la fase acuosa (Zhang *et al.*, 2015).

En el presente estudio, el pH mínimo fue de 8.25 y el máximo fue de 9.89, esto demuestra la capacidad de la microalga *Chlorella spp.* para tolerar un amplio rango de pH con crecimiento satisfactorio, lo cual resulta benéfico para el estudio y tratamiento del CO₂ con esta microalga (Zúñiga *et al.*, 2013).

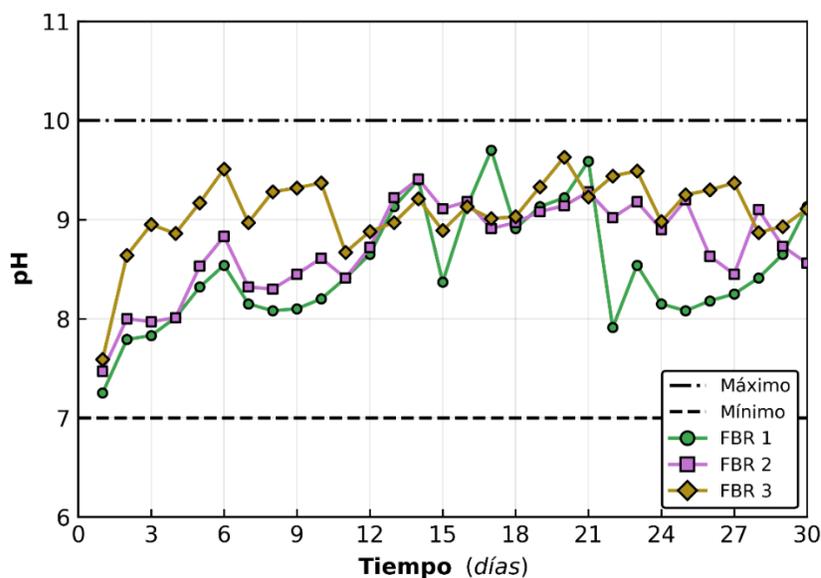


Figura 3.12 Comportamiento de pH a diferentes concentraciones de CO₂ y luminosidad de 2000 lux

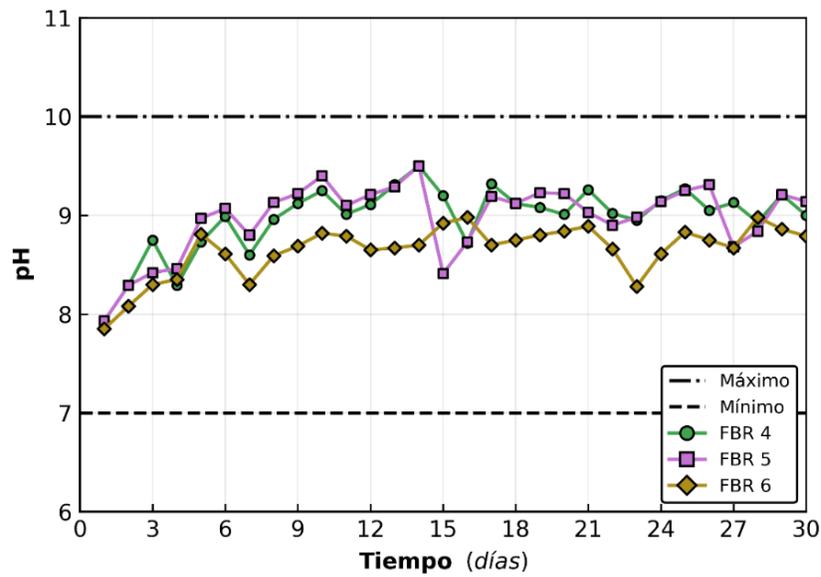


Figura 3.13 Comportamiento del pH a diferentes concentraciones de CO₂ y luminosidad de 3000 lux

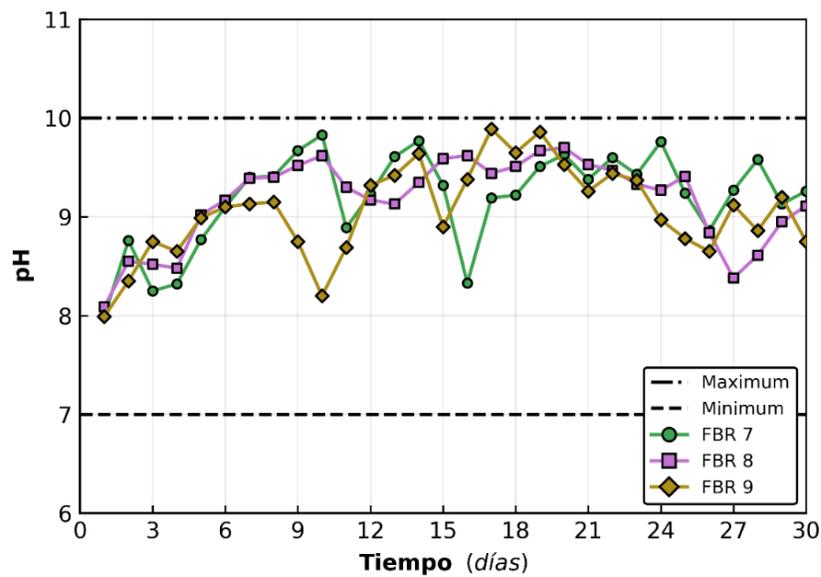


Figura 3.14 Comportamiento del pH a diferentes concentraciones de CO₂ y luminosidad de 4000 lux

3.5.4 Caracterización de la biomasa obtenida durante las pruebas a nivel laboratorio

Para la evaluación de biomasa que se generó al final del cultivo de *Chlorella spp.* y de *Spirulina máxima* se evaluaron carbohidratos, lípidos, proteínas, clorofila y peso seco cuyos resultados se describen a continuación y se pueden observar de manera resumida en las tablas 3.7 y 3.8.

- **Carbohidratos**

Para la obtención de carbohidratos se realizó una curva de calibración (figura 3.15) en la cual se relacionó la concentración y la absorbancia, con un ajuste de datos R^2 del 97.1%, con la cual se obtuvieron los datos y mediante una interpolación se determinó la concentración de 608.11 mg/L para la especie *Chlorella spp.*

Dominguez en 2014 reportó un valor promedio de carbohidratos para *Chlorella spp.* de 593.92 mg/L.

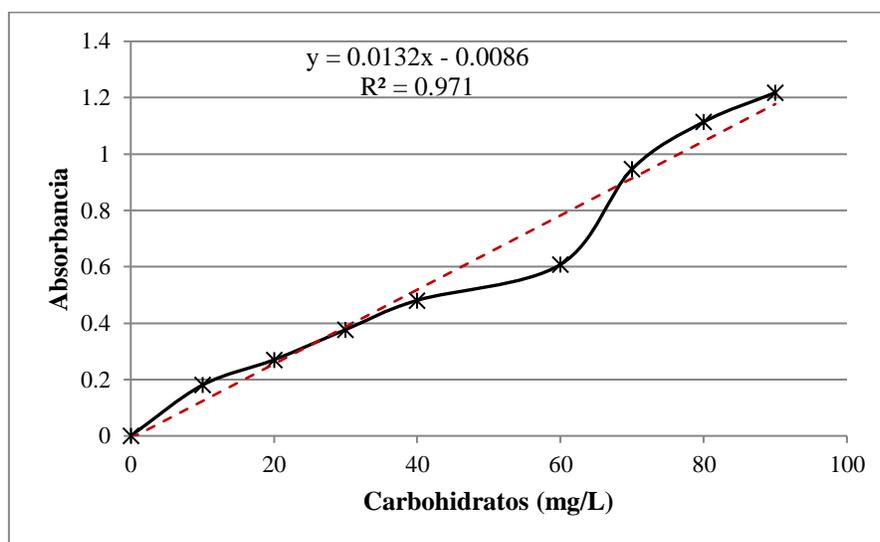


Figura 3.15 Curva patrón de Carbohidratos

- **Lípidos**

Miguel (2012) reportó la acumulación y productividad de lípidos contenidos en *Chlorella spp.* variando los factores contenido de CO_2 , irradiación, fotoperiodo y aireación. La productividad de lípidos óptima predicha por el modelo estadístico dentro del intervalo estudiado fue 69.7 ± 5.9 $mg \cdot L^{-1} \cdot día^{-1}$.

En el presente trabajo realizado se determinó la cantidad de lípidos totales presentes en la microalga con las mejores condiciones obtenidas de las cinéticas anteriormente mencionadas. El resultado que se obtuvo fue de 13.20 g/100g de biomasa para la especie *Chlorella spp.* y de 5.34 g/100g de biomasa para la especie *Spirulina máxima*, ambos resultados obtenidos durante el suministro de la dosis alta (1.5 mL/L y 150% respectivamente) de medio de cultivo.

Recalcando que los factores iluminación, temperatura, suministro de CO₂ y concentración del medio indicado intervienen en los resultados obtenidos dentro de esta investigación.

- **Proteínas**

De acuerdo con Barajas *et al*, (2012) la concentración de proteínas contenidas en la microalga *Chlorella Vulgaris* varía entre 150-280 mg/mL. En el presente estudio la microalga *Chlorella spp.* el valor de proteínas fue de 233.74 mg/mL obtenido en la dosis alta de 1.5 mL/L de MBB, valor que se encuentra dentro del rango reportado por el autor anteriormente mencionado. En cuanto a *Spirulina máxima* el valor obtenido fue de 189.54 mg/mL; con esto se puede observar que en cuanto a proteínas la especie *Chlorella spp* presenta mayor contenido que la especie *Spirulina máxima*.

- **Clorofila**

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 CO₂ en fotobiorreactores a escala laboratorio (Barajas-Solano, 2012) realizó extracciones de pigmentos en *Chlorella spp.* que había sido irradiada con luz ultravioleta, obteniendo hasta 65 µg/mL de clorofila total.

En el presente trabajo se registró un resultado de 49.23 mg/L totales, los cuales corresponden 30.61 mg/L para clorofila tipo a y 18.62 mg/L para clorofila b para la especie *Chlorella spp.* El valor más elevado de clorofila tipo a, se debe a que éste pigmento es el que interviene de forma directa en el proceso de fotosíntesis para la transformación de la energía luminosa a energía química.

Los valores reportados para la especie *Chlorella vulgaris* fueron de 11 µg/mL, la especie se cultivó en aguas residuales, con una alta concentración de CO₂ y alta temperatura (30 °C) según (Chinnasamy, 2009).

En cuanto a la especie *Spirulina máxima* únicamente presenta clorofila tipo a, con un valor máximo de 15.65 mg/g obtenida en la dosis alta de medio de cultivo.

En las tablas 3.10 y 3.11 se muestra la caracterización de la microalga *Chlorella spp.* y *Spirulina máxima* respectivamente.

Tabla 3.10 Caracterización de la biomasa de *Chlorella spp.*

Dosis Bold Basal (mL)	Biomasa (g/L)	Carbohidratos mg/L	Lípidos g/100g biomasa	Proteínas mg/mL	Clorofila mg/g	
					a	b
0.5	0.27	579.73	16.10	474.89	10.90	5.87
1	1.16	597.74	14.28	449.90	14.23	8.54
1.5	1.71	608.11	13.20	433.74	30.61	18.62

Tabla 3.11 Caracterización de la biomasa de *Spirulina máxima*.

Dosis UTEX (%)	Biomasa (g/L)	Carbohidratos mg/L	Lípidos (g/100g biomasa)	Proteínas (mg/mL)	Clorofila mg/g
					A
50	1.34	502.45	3.12	289.37	11.21
100	3.24	589.76	4.28	357.45	12.91
150	7.19	615.31	5.34	389.54	15.65

- **Tasa de crecimiento celular**

En la tabla 3.12 se muestran los datos obtenidos de la velocidad específica de crecimiento (divisiones/ día) y el tiempo de duplicación (días). Liao (2014) reportó para la microalga *Chlorella pyrenoidosa* una velocidad de 1.74 días⁻¹. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo la dosis 1.5 ml presenta una mayor velocidad específica de crecimiento, es decir, crece progresivamente y se divide en 1.99 ≈ 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 3.12 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

- **Peso seco**

La cantidad total de biomasa presente en la muestra puede medirse en términos de peso seco por unidad de volumen (García, 2012). Como se aprecia en la figura 3.16, el peso seco obtenido del cultivo fue de 0.61 g/L, ligeramente superior a lo reportado por Alvarado (2011) y Chiu *et al.*, (2008) quienes obtuvieron una productividad de biomasa de la microalga *Chlorella sp.* de 0.370 y 0.530 g/L respectivamente. Brenes *et al.*, (2014) reportaron la máxima producción de biomasa alcanzada de la especie *Chlorella spp.*, es de 0.574 gramos por litro.

Esto puede deberse a las condiciones a las cuales fue sometida la microalga en el presente estudio: mayor intensidad luminosa (4000 lux), concentración de nutrientes (1.5 mL/L medio Bold Basal), y suministro de CO₂ (2% v/v).



Figura 3.16 Peso seco de la microalga *Chlorella spp.*

3.6 Propiedades reológicas de la biomasa obtenida

Conocer el comportamiento reológico de los fluidos es de gran importancia en la actualidad, ya que representan estrategias para el control y monitoreo de bioprocesos ambientales, diseño, evaluación, operación de equipos y desarrollo de productos.

3.6.1 Reología de la microalga *Chlorella spp.*

El mejor resultado que se obtuvo de biomasa en las etapas previas (4000 Lux, 2% CO₂ v/v) fue el que se utilizó para tomar las muestras del análisis reológico.

La medición y captura de los datos obtenidos se realizó utilizando las rutinas de análisis del software Rheoplus /32 V2.81 con el que se opera el reómetro. A partir de dicho estudio se obtuvieron los datos de velocidad de corte (1/s), esfuerzo de corte (Pa), y Viscosidad (Pa/s) en las diferentes etapas de cultivo: inicial (fase inicial de crecimiento), intermedio (fase exponencial de crecimiento) y final (punto máximo de crecimiento), para mayor información consultar los Anexos C, D y E.

La ecuación de Herschel-Bulkley da como resultado modelos más precisos de comportamiento reológico cuando se dispone de datos experimentales adecuados, es por esto que se realizó el ajuste de los datos a este modelo, reflejados en las gráficas 3.17, 3.18. y 3.19, así como sus coeficientes de regresión respectivos.

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n \quad (3.1)$$

Dónde:

τ = esfuerzo de corte, τ_0 = esfuerzo de corte inicial, k = índice de consistencia, $\dot{\gamma}$ = tasa de corte y n = índice de comportamiento de flujo

El comportamiento reocinético de la microalga fue monitoreado durante su operación batch en un tiempo de 40 días. El primer parámetro analizado fue el comportamiento del perfil esfuerzo de corte Vs velocidad de corte, el cual es mostrado en la figura 3.17. La microalga mostró un comportamiento de un fluido no Newtoniano tipo dilatante, en el cual se puede apreciar un incremento en el esfuerzo de corte al incrementar la tasa de corte formado curvas típicas de un fluido dilatante (figura 3.17). Este comportamiento pudo corroborarse al observar los valores de los índices de comportamiento de flujo superiores a la unidad ($\eta > 1$), característicos de los fluidos dilatantes.

La figura 3.17 nos muestra el ajuste de los datos experimentales en la fase inicial de cultivo contra el modelo de Herschel-Bulkley, obteniendo Índice de consistencia K de 7.1635×10^{-5} cP, Índice de comportamiento de flujo η : 1.87 y Esfuerzo de corte inicial τ_0 : 0.05 con un $R^2=0.985$

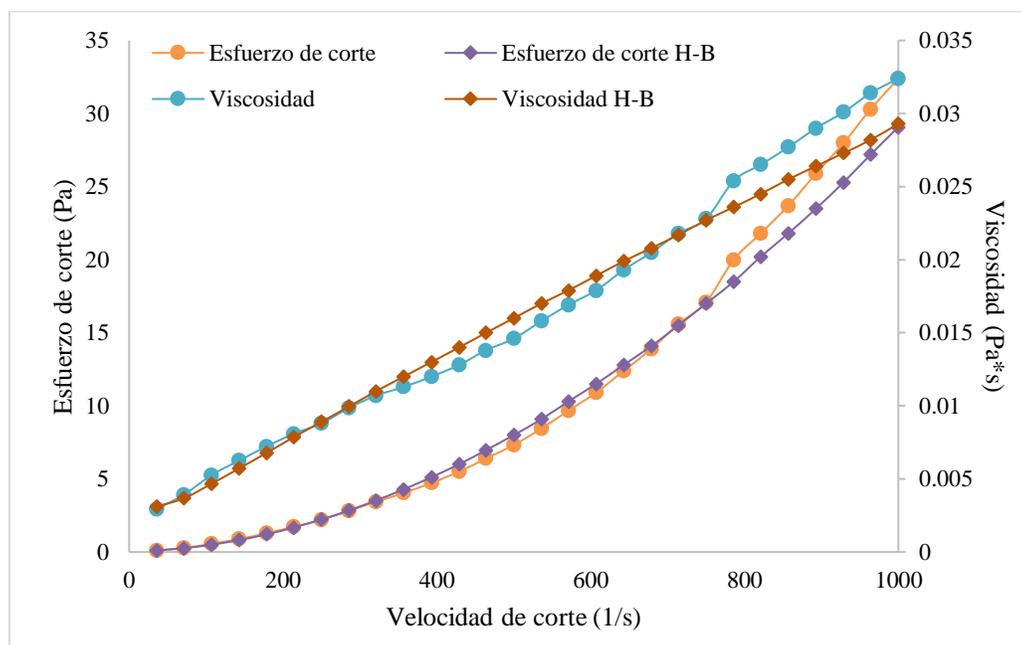


Figura 3.17 Datos experimentales vs Modelo H-B (Fase inicial de cultivo)

Si la viscosidad aparente aumenta con el incremento de la relación de deformación, es decir, que $\eta > 1$, el fluido se nombra dilatante; aquí el fluido se engruesa con un aumento en la tasa de corte (Shames, 1995).

La figura 3.18 nos muestra el ajuste de los datos experimentales en la fase exponencial de crecimiento contra el modelo de Herschel-Bulkley, obteniendo Índice de consistencia K de 6.71×10^{-5} cP, Índice de comportamiento de flujo η : 1.88 y Esfuerzo de corte inicial τ_0 : 0.05 con un $R^2=0.98$

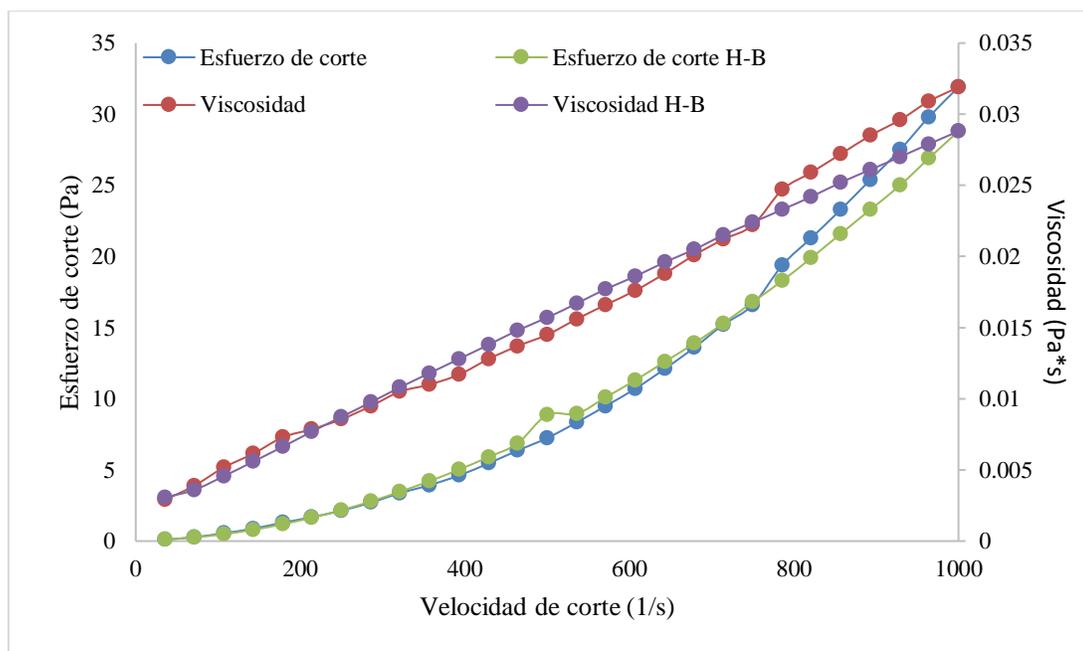


Figura 3.18 Datos experimentales vs Modelo H-B (Fase exponencial de cultivo)

Cristianini & Silva (2015) realizaron estudios reológicos en suspensiones de la microalga *Chlorella spp.* donde concluyeron que dichas suspensiones, en cualquier condición de proceso, presentan un comportamiento reológico típico de un fluido dilatante, ya que obtuvieron valores de $\eta > 1$.

De acuerdo a lo mencionado por Shames (1995), se observó que los valores de índice de comportamiento η indican un comportamiento no newtoniano, con características de fluido dilatante dentro de la gama de valores utilizados para la velocidad de deformación y la concentración de biomasa, ya que el software arrojó resultados para índice de comportamiento de flujo $\eta > 1$.

La figura 3.19 muestra el ajuste de los datos experimentales en el máximo punto de crecimiento de la microalga contra el modelo de Herschel-Bulkley, obteniendo Índice de consistencia K de 6.59×10^{-5} cP, Índice de comportamiento de flujo n : 1.8811 y Esfuerzo de corte inicial τ_0 : 0.06 con un $R^2=0.992$

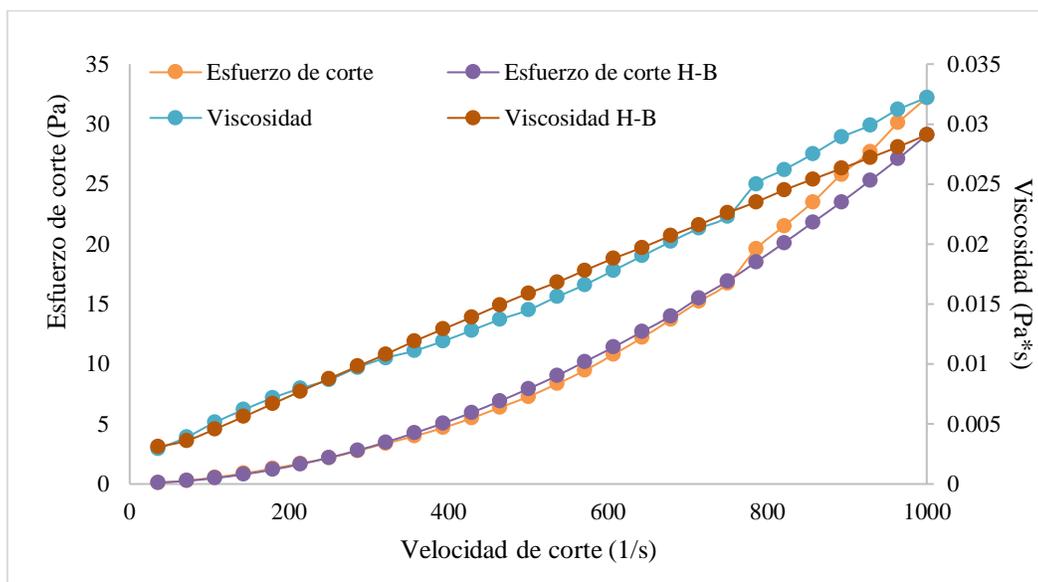


Figura 3.19 Datos experimentales vs Modelo H-B (Fase máxima de crecimiento)

Un medio que contiene microorganismos es normalmente newtoniano, y la viscosidad es cercana a la del agua pura, sin embargo cuando el medio contiene concentraciones muy elevadas de biomasa, el fluido pasa a ser no newtoniano de tipo pseudoplástico o dilatante. De acuerdo a la Ley de la potencia de Ostwald, valores de $n < 1$ el comportamiento del fluido es pseudoplástico y $n > 1$ indica que el comportamiento del fluido es de tipo dilatante.

Debido a que en los casos presentados anteriormente n es mayor a 1 con valores de 1.87, 1.88 y 1.88 se concluye que el fluido tiene un comportamiento no newtoniano de tipo dilatante. Este comportamiento es característico de suspensiones y se presenta cuando al aumentar la velocidad de corte produce un aumento en la viscosidad del fluido.

En todos los resultados el valor de R^2 fue superior a 0.98, por lo que se consideran como resultados satisfactorios. El estadístico R^2 indica que el modelo explica la variabilidad del esfuerzo de corte con el gradiente de velocidad.

3.6.2 Reología de la microalga *Spirulina máxima*

La mayor concentración de biomasa obtenida al final de los experimentos en las etapas previas fue la que se utilizó para tomar las muestras del análisis reológico.

Se obtuvieron los datos de velocidad de corte (1/s), esfuerzo de corte (Pa), y Viscosidad (Pa*s) en las diferentes etapas de cultivo: inicial (fase inicial de crecimiento), intermedio (fase exponencial de crecimiento) y final (punto máximo de crecimiento), para mayor información consultar los Anexos F, G y H.

Se realizó el ajuste de los datos al modelo de Herschel-Bulkley, debido a que la ecuación da como resultado modelos más precisos de comportamiento reológico cuando se dispone de datos experimentales adecuados, reflejados en las gráficas 3.20, 3.21 y 3.22, así como sus coeficientes de regresión respectivos.

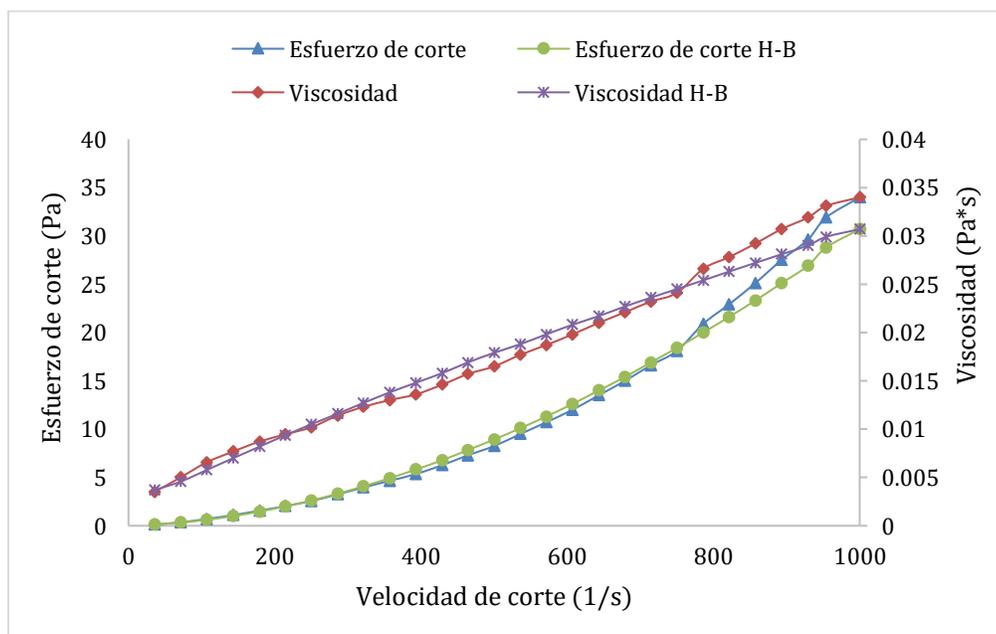


Figura 3.20 Datos experimentales vs Modelo H-B (Fase inicial de cultivo)

La figura 3.20 nos muestra el ajuste de los datos experimentales en la fase inicial de cultivo contra el modelo de Herschel-Bulkley, obteniendo un índice de consistencia (K) de 1.33×10^{-4} cP, Índice de comportamiento de flujo η : 1.781 y Esfuerzo de corte inicial τ_0 : 0.0529, el coeficiente de determinación para este estudio fue de $R^2=0.986$.

El fenómeno de dilatancia se produce debido a la fase dispersa del fluido en el cual tiene lugar un empaquetamiento de las partículas, dejando a la fase continua casi sin espacio. Si a continuación se aplica un esfuerzo, el empaquetamiento se altera y los huecos entre las partículas dispersas aumentan. Además, conforme aumenta la velocidad de deformación aplicada, mayor turbulencia aparece y más difícil es el movimiento de la fase continua por los huecos, dando lugar a un mayor esfuerzo cortante, este incremento puede apreciarse gráficamente en la figura 3.21 donde a mayor tasa de corte, mayor esfuerzo de corte en el fluido. Este comportamiento se modeló matemáticamente con los datos experimentales por lote mediante el modelo de Herschel-Bulkley (HB) el cual está descrito en la ecuación 3.1. Dicho modelo matemático presentó coeficientes de correlación matemática de $R^2 > 0.99$.

La figura 3.21 nos muestra el ajuste de los datos experimentales en la fase exponencial de crecimiento contra el modelo de Herschel-Bulkley, obteniendo Índice de consistencia K de 9.57×10^{-5} cP, Índice de comportamiento de flujo η : 1.829 y Esfuerzo de corte inicial τ_0 : 0.0544 con un $R^2=0.993$

Se observó que los valores de índice de comportamiento η indican un comportamiento no newtoniano, con características de fluido dilatante dentro de la gama de valores utilizados para la velocidad de deformación y la concentración de biomasa, ya que el software arrojó resultados para índice de comportamiento de flujo $\eta > 1$.

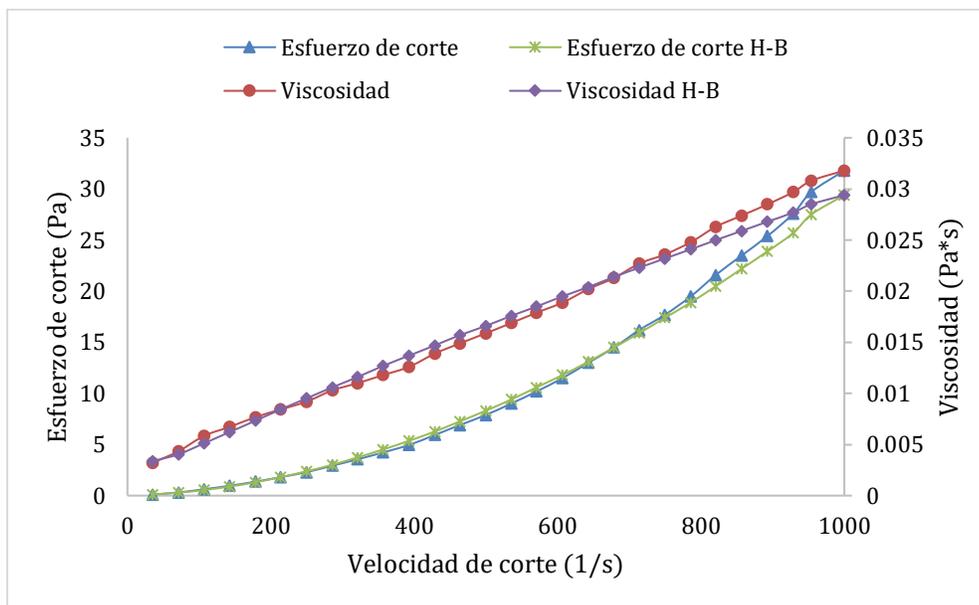


Figura 3.21 Datos experimentales vs Modelo H-B (Fase exponencial de cultivo)

El comportamiento reocinético de la microalga fue monitoreado durante su operación batch en un tiempo de 40 días. El primer parámetro analizado fue el comportamiento del perfil esfuerzo de corte Vs velocidad de corte, el cual es mostrado en la figura 3.22. La microalga mostró un comportamiento de un fluido no Newtoniano tipo dilatante, en el cual se puede apreciar un incremento en el esfuerzo de corte al incrementar la tasa de corte formado curvas típicas de un fluido dilatante (figura 3.22). Este comportamiento pudo corroborarse al observar los valores de los índices de comportamiento de flujo superiores a la unidad ($\eta > 1$), característicos de los fluidos dilatantes.

La figura 3.22 nos muestra el ajuste de los datos experimentales en el máximo punto de crecimiento de la microalga *Spirulina máxima* contra el modelo de Herschel-Bulkley, obteniendo Índice de consistencia K de 6.87×10^{-5} cP, Índice de comportamiento de flujo η : 1.877 y Esfuerzo de corte inicial τ_0 : 0.0562, el valor del coeficiente de determinación fue de $R^2=0.995$.

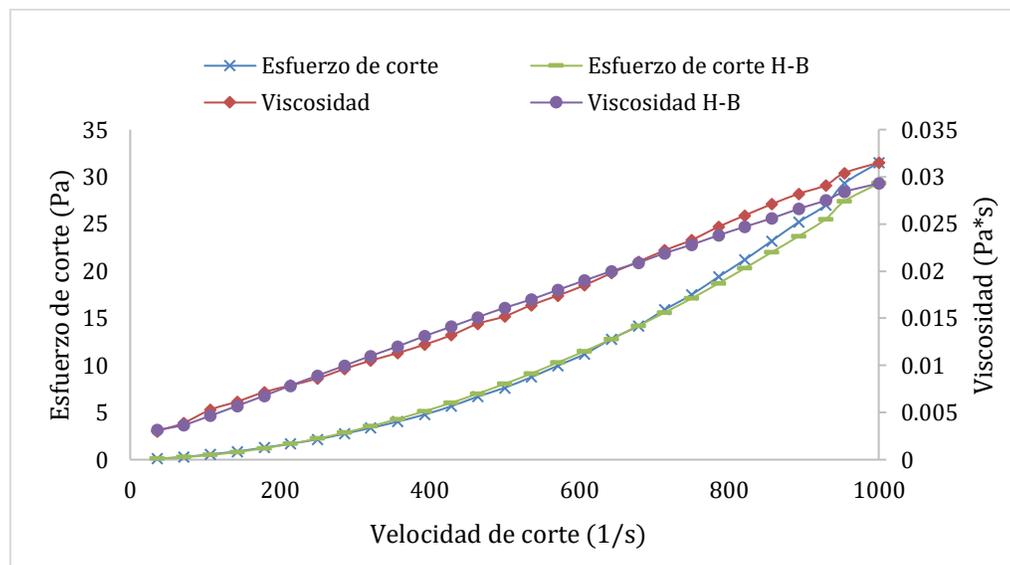


Figura 3.22 Datos experimentales vs Modelo H-B (Fase máxima de crecimiento)

Un medio que contiene microorganismos es normalmente newtoniano, y la viscosidad es cercana a la del agua pura, sin embargo cuando el medio contiene concentraciones muy elevadas de biomasa, el fluido pasa a ser no newtoniano de tipo pseudoplástico o dilatante.

De acuerdo a la Ley de la potencia de Ostwald, valores de $\eta < 1$ el comportamiento del fluido es pseudoplástico y $\eta > 1$ indica que el comportamiento del fluido es de tipo dilatante.

Debido a que en los casos presentados anteriormente η es mayor a 1 con valores de 1.78, 1.83 y 1.88 se concluye que el fluido tiene un comportamiento de tipo dilatante.

En todos los resultados el valor de R^2 fue superior a 0.98, por lo que se consideran como resultados satisfactorios. El estadístico R^2 indica que el modelo explica la variabilidad del esfuerzo de corte con el gradiente de velocidad.

La información obtenida de los estudios de las propiedades reológicas permitió efectuar oportunamente cambios de diseño y operacionales en el fotobiorreactor y con esto disminuir los riesgos de roturas, obstrucción de tuberías y fallas operacionales en el sistema de bombas de recirculación.

3.7 Correlación de propiedades reológicas

Con los resultados obtenidos en los estudios de las propiedades reológicas, se realizó la correlación del índice de comportamiento de flujo (η) y la viscosidad con la densidad celular del cultivo para obtener dos gráficos representativos de éstas dos variables. La figura 3.23 representa la correlación del crecimiento celular de la microalga con el índice de comportamiento y, la figura 3.24 muestra la correlación de la viscosidad (Pa/s) con la densidad celular del cultivo; éstos gráficos presentan gran importancia ya que es posible predecir el nivel de concentración celular del cultivo de la microalga a través de la medición reológica del índice de comportamiento de flujo (η) o de la viscosidad y puede ser utilizada como una herramienta de respuesta rápida para el monitoreo del cultivo.

La correlación mostrada en la figura 3.23 se ajustó mediante una regresión logarítmica a los datos experimentales con $R^2=0.976$, lo cual indica que existe una correlación satisfactoria con respecto a estas dos variables.

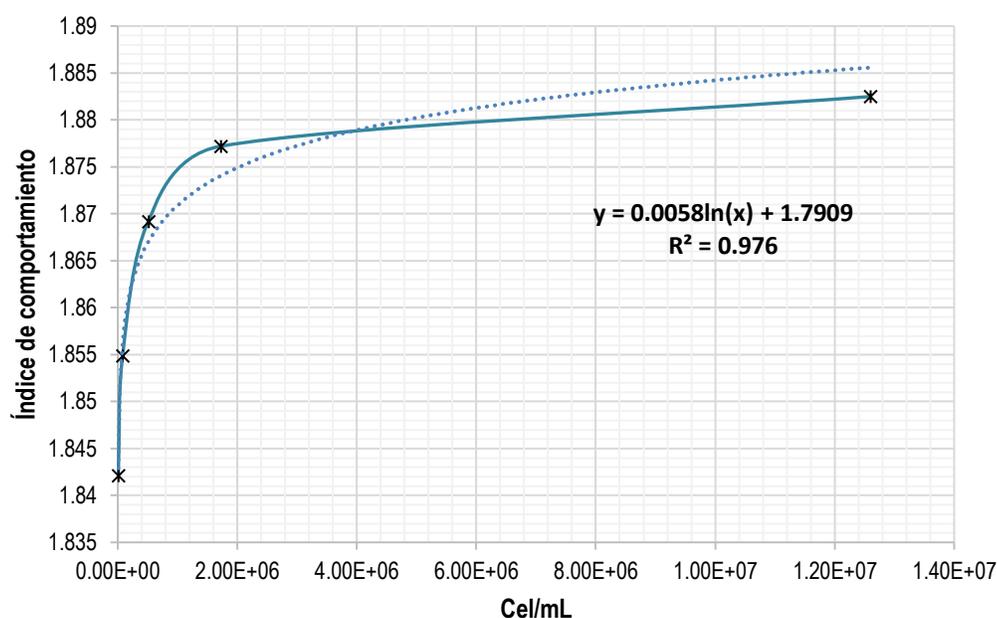


Figura 3.23 Correlación de η con densidad celular

La tabla 3.13 muestra los datos de la densidad celular con su respectivo parámetro reológico del índice de comportamiento de flujo durante el crecimiento de la microalga. Se puede observar una

relación directamente proporcional a medida que crece el número de células, aumenta el índice de comportamiento de flujo.

Tabla 3.13 Densidad celular e índice de comportamiento

Muestra	Densidad celular (cel/mL)	η [-]
1	7.93×10^3	1.8421
2	8.1×10^4	1.8549
3	5.12×10^5	1.8692
4	1.72×10^6	1.8772
5	1.26×10^7	1.8811

La correlación mostrada en la figura 3.24 entre la densidad celular y la viscosidad se ajustó mediante una regresión logarítmica a los datos experimentales con $R^2=0.967$, lo cual indica que existe una correlación satisfactoria con respecto a estas dos variables.

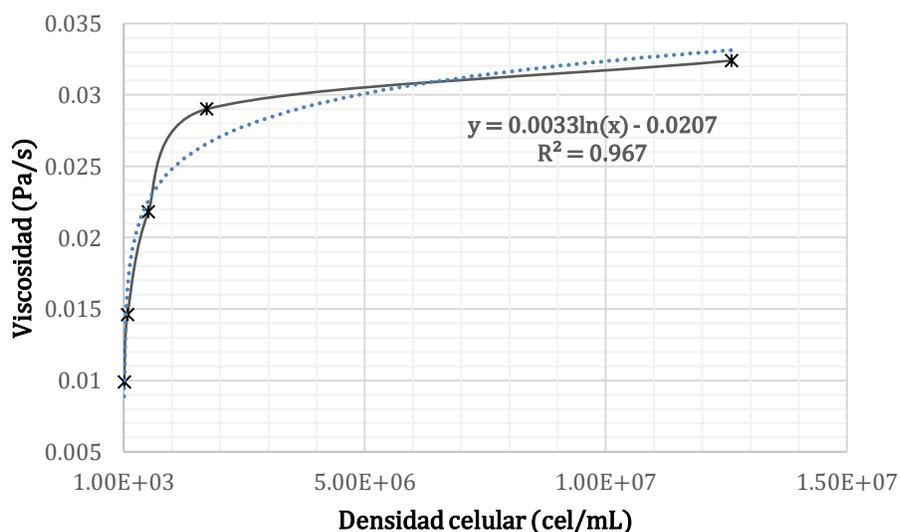


Figura 3.24 Correlación de viscosidad con densidad celular

La tabla 3.14 muestra los datos de la densidad celular en relación con la viscosidad del cultivo durante el crecimiento de la microalga. Se puede observar una relación directamente proporcional a medida que crece el número de células, aumenta la viscosidad.

Tabla 3.14 Densidad celular y viscosidad

Muestra	Densidad celular (cel/mL)	Viscosidad [Pa/s]
1	7.93×10^3	0.00987
2	8.1×10^4	0.0146
3	5.12×10^5	0.0218
4	1.72×10^6	0.029
5	1.26×10^7	0.0324

La correlación satisfactoria entre una variable reológica y la densidad celular del cultivo obtenida en la presente investigación es una contribución al conocimiento científico que constituye el resultado de la actividad científica realizada. Los resultados sugieren que es posible desarrollar estudios para el desarrollo de modelos matemáticos que correlacionen la viscosidad y el índice de comportamiento de flujo con el crecimiento celular de las microalgas.

Estos modelos permiten que la viscosidad o el índice de comportamiento puedan ser utilizados como una variable de respuesta rápida durante el desarrollo de este tipo de bioprocesos utilizando microalgas.

3.8 Diseño de un fotobiorreactor 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 (2.5) 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 :

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

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 esto 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 2.9 tomando un valor intermedio de los valores (0.8):

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

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

El diseño del fotobiorreactor se basó en la ingeniería conceptual, ingeniería básica e ingeniería de detalle (Anexos F, G) para su implementación a escala piloto (Herrera, 2017). El sistema de fotobiorreactores se acopló como parte complementaria del proceso de digestión anaerobia (Anexo H), así como el diagrama de tuberías e Instrumentación P&ID y el diseño de la sección de fotobiorreactores utilizando AUTOCAD 2013 se pueden observar con detalle en los anexos I, y J del presente trabajo.

La teoría TRIZ o teoría de resolución inventiva de problemas

La teoría TRIZ es producto de un hombre, Genrich S. Altshuller, quien se rehusó a aceptar los paradigmas establecidos sobre la creatividad y el desarrollo tecnológico. Esta visión lo llevó a

sentar las bases de una nueva manera de percibir la creatividad y la evolución de los sistemas tecnológicos, e igualmente a la creación de una dimensión diferente del proceso de innovación: una dimensión controlable y disponible sobre demanda.

Describir esta nueva perspectiva tecnológica no es tarea fácil, TRIZ ha sido descrito como una ciencia, una metodología, una colección de métodos heurísticos y como una nueva disciplina, etc. Sin embargo TRIZ es probablemente un poco de todo esto: una ciencia naciente que ofrece diversas metodologías para resolver problemas complejos (ARIZ); una colección de métodos heurísticos basados en el conocimiento, capaces de dirigir la creatividad de un individuo durante la resolución de un problema inventivo (las 76 soluciones Standard, la matrice de resolución de contradicciones técnicas, etc.). Igualmente, el enfoque de TRIZ ha sentado las bases de una nueva disciplina: la Innovación Asistida por Computadora o la Invención Asistida por Computadora (Computer Aided Invention / Innovation).

Las bases teóricas de TRIZ

La teoría TRIZ fue desarrollada en la Unión soviética de los años 40, gracias a los esfuerzos de su creador, G. Altshuller que intentaba identificar ciertos principios generales para guiar sus actividades como inventor. Altshuller estaba particularmente interesado en la reducción del tiempo de concepción de una invención y en desarrollar un proceso bien estructurado, adaptable y reutilizable para dirigir la resolución de un problema (Savransky, 2000), (Salamatov, 1999).

Teniendo en cuenta estos objetivos, Altshuller y sus colaboradores buscaron los fundamentos de tal teoría en cuatro áreas esenciales:

- (1) Un vasto análisis de las bases de patentes internacionales
- (2) Un estudio sobre los métodos disponibles de resolución de problemas
- (3) Un amplio análisis de la literatura científica
- (4) Un estudio sobre el comportamiento psicológico de los inventores

El análisis de estas cuatro áreas condujo a la formalización de los principios fundamentales de TRIZ, a la creación de un conjunto de herramientas basadas en el conocimiento capaces de guiar la resolución de problemas complejos y a la identificación de un conjunto de tendencias generales para explicar la evolución de cualquier sistema técnico. Esto habría de sentar más tarde, los fundamentos de la primera base de conocimientos sobre la innovación y por ende, de la innovación basada en el conocimiento.

El proceso de análisis desplegado en los dominios anteriormente citados, permitió el desarrollo de los conceptos fundamentales de TRIZ. Entre estos, deben subrayarse los siguientes (Altshuller, 2007):

- Las tendencias de evolución de los sistemas técnicos. La evolución de un sistema técnico está regida por ciertas tendencias bien definidas. Entre estas la más importante es el concepto de sistema ideal, que implica que todo sistema evoluciona hacia el incremento de su grado de perfeccionamiento. Este grado de perfeccionamiento puede determinarse mediante la relación que existe entre las funciones útiles de un sistema y la suma de los costos y efectos indeseables asociados al sistema.
- La contradicción y el concepto de problema inventivo. En TRIZ un problema se formaliza mediante una contradicción, que puede definirse como la condición en la cual dos exigencias o requerimientos de un sistema son mutuamente exclusivos y sin embargo deben estar asociados para alcanzar un mismo objetivo. La resolución de la contradicción (mediante la aplicación de las herramientas adecuadas), elimina el conflicto entre ambos factores, contrariamente a los enfoques tradicionales que favorecen el compromiso.
- El proceso de innovación puede desplegarse sistemáticamente. La aplicación de TRIZ ha demostrado su habilidad a eliminar las barreras entre diferentes disciplinas. En otros términos, que las herramientas de TRIZ permiten acceder a un conjunto de mejores prácticas, a soluciones y estrategias de resolución de problemas inventivos altamente creativas. Los conceptos fundamentales de TRIZ en coordinación con su variado y equilibrado repertorio de herramientas, permiten delimitar el espacio de solución de un problema y por este medio, producir de manera eficaz y casi sistemática una solución.

Las ventajas y límites de la teoría TRIZ

Varias de las múltiples ventajas de la teoría TRIZ han sido ya mencionadas (i.e. la capacidad de TRIZ a eliminar las barreras entre disciplinas, a generar de manera casi sistemática una solución, a evitar el compromiso durante la resolución de un problema, etc.), sin embargo, las siguientes características tienen un rol preponderante en el ambiente industrial y empresarial de nuestros días:

- TRIZ como un enfoque de resolución de problemas, es un ambiente donde interactúan de manera equilibrada dos dimensiones de la creatividad: una dimensión técnica (contenida en las herramientas de TRIZ y basadas en el conocimiento) y una dimensión psicológica (técnicas para disminuir la influencia de la inercia psicológica e interpretación de las vías de solución propuestas).
- La comprensión y aplicación de los conceptos y herramientas de TRIZ, permiten a los individuos mejorar sus capacidades creativas. La razón de esto, reside en el proceso convergente intrínseco a TRIZ. Este proceso conduce a conceptos que han probado su eficiencia en problemas similares en diferentes dominios. Lo que a su vez permite la creación de analogías transversales, elemento capital en los procesos creativos.
- Los procesos de pensamientos propios de este enfoque, ofrecen vías de solución que permiten explotar eficientemente los recursos disponibles dentro de una empresa. Consecuentemente, las soluciones desplegadas ofrecen una relación beneficio-costos bastante positiva.
- Ciertas herramientas de TRIZ al ser desplegadas, facilitan la detección de tendencias de evolución en productos o tecnologías.
- Como cualquier otro enfoque de resolución de problemas, TRIZ posee varios límites, entre estos, los siguientes son particularmente importantes en el contexto de este documento.
- TRIZ delimita el espacio de solución de un problema. Sin embargo el usuario debe, cada vez que enfrenta un problema, desplegar el proceso completo de resolución de problemas.
- Las herramientas de TRIZ están basadas en el conocimiento general, de manera que estas puedan ser empleadas en múltiples disciplinas. El inconveniente ligado a esta versatilidad es el siguiente: el conocimiento de naturaleza general produce un marco para el razonamiento, no obstante, la aplicación de este conocimiento en una situación específica puede revelarse complicado. Esta limitación se reduce mediante el entrenamiento y formación continua.
- Algunas herramientas de TRIZ como el algoritmo ARIZ, requieren de mucho entrenamiento y dedicación para poder desplegarlo eficientemente.
- Mucha información de gran valor aún está en traducción en diferentes países.

A continuación, se presentan las situaciones en las que puede emplear TRIZ (Petrov, 2003):

- La solución de problemas creativos e inventivos de cualquier complejidad y tendencia sin exceso ni variantes.
- La solución de problemas científicos e investigativos.
- Identificar los problemas y tareas al trabajar con sistemas técnicos y durante su desarrollo.
- Identificar y eliminar las causas de defectos y averías.
- Utilización efectiva del máximo de los recursos técnicos y naturales para la solución de muchos problemas.
- Pronósticos del desarrollo de sistemas técnicos (ST) y la obtención de soluciones y perspectivas.
- Valoración objetiva de las soluciones.
- Sistematización del conocimiento en cualquier área de la actividad humana, lo que permite utilizarlo de un modo más efectivo y desarrollar ciencias concretas sobre una base en principio nueva.
- Desarrollo del pensamiento e imaginación creativa.
- Desarrollo de la calidad de la personalidad creativa.
- Desarrollo de colectivos creativos.

Constataciones

La teoría de resolución de problemas inventivos, es actualmente un enfoque ampliamente aceptado por la industria y la academia para resolver los problemas tecnológicos relativos al proceso de innovación. Esta teoría ha sido exitosamente aplicada en diferentes áreas técnicas, en negocios y en áreas no tecnológicas.

Su expansión y adopción ha seguido un ritmo exponencial en la industria en los últimos 10 años. En nuestro País TRIZ ha recibido un gran impulso en el último lustro. Es evidente que las empresas en México que consigan apropiarse de las herramientas de TRIZ, podrán derivar mayor valor de sus recursos intelectuales y mejorar considerablemente la rentabilidad y competitividad en sus mercados.

Es necesario señalar que el proceso de apropiación de la teoría, requiere del apoyo incondicional de la Dirección de la empresa, de paciencia y de esfuerzo constante, además de la oportunidad de demostrar la valía y capacidad de este nuevo enfoque para administrar el proceso de innovación.

Proceso de resolución básico

La teoría TRIZ sugiere un proceso básico de resolución de problemas que emplea tres conceptos: el modelado de un problema como una contradicción, el planteamiento del concepto de sistema ideal y el uso de los recursos de un sistema como base para el desarrollo de soluciones inventivas.

Contradicciones: Surgen cuando en un sistema, la tentativa por mejorar un cierto parámetro ocasiona la degradación inaceptable de otro parámetro también útil o cuando un sistema exige dos estados mutuamente excluyentes para alcanzar un objetivo (Savransky, 2000). Hay dos tipos de contradicciones: (1) contradicción física: Requiere la existencia simultánea de dos estados o condiciones mutuamente excluyentes en un solo componente o parámetro en un sistema. (2) contradicción técnica: la mejora, modificación o transformación de una característica útil de un sistema provoca la degradación de otra característica útil o un bloqueo en el sistema.

Sistema ideal: Los sistemas evolucionan hacia un comportamiento ideal. La evolución va en dirección de aumentar los beneficios y disminuir los costos (Rantanen y Domb, 2008). El resultado extremo de esta evolución es el resultado ideal, donde los beneficios están presentes y los costos no. Es la solución ideal a un problema técnico (Fiorineschi, Saverio, & Rotini, 2018).

Recurso: Según TRIZ, la evolución de cualquier sistema técnico depende de sus recursos disponibles. Un recurso es, por ejemplo, un elemento disponible en un sistema o entorno que permanece inactivo o subestimado, pero con el potencial de generar un efecto útil o una acción valiosa sin costo adicional o con un costo mínimo. Algunos ejemplos de recursos son sustancias, campos de energía, espacio, tiempo e información (Altshuller, 2007).

3.8.1 Montaje de los fotobiorreactores airlift a escala piloto

Se implementaron 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, mejor exposición a los ciclos de luz y oscuridad, lo que favorece la fijación de CO_2 suministrado. Estos fotobiorreactores se diseñaron para su instalación dentro del Instituto Tecnológico de Orizaba como parte de un proceso integral, se espera tratar el CO_2 generado durante el proceso de digestión anaerobia de lodos residuales, de lo que hará que la planta piloto cuente con un proceso autosustentable.

En la figura 3.24 se observa la evolución en el montaje de la sección de fotobiorreactores a nivel planta piloto de acuerdo a los diseños antes mencionados.



Figura 3.25 Montaje de la sección de fotobiorreactores nivel planta piloto

Durante la instalación se colocó la base de los fotobiorreactores junto con las lámparas utilizadas, dichas se colocaron en la parte central de la base. 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. Se hizo la instalación de 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_2 . Finalizando con la instalación del tanque de CO_2 artificial así como las conexiones necesarias para su posterior utilización.

La figura 3.25 muestra cada una de las partes que conforman la sección de fotobiorreactores a nivel planta piloto, que va desde los filtros desulfuradores para el posterior almacenamiento del biogás en bolsas de membrana, el generador eléctrico y por último la disposición final del CO₂ en los fotobiorreactores tubulares, conformado por un sistema de bombas peristálticas para la recirculación del medio, panel de control y 4 lámparas de luz fluorescente.



Figura 3.26 Planta piloto de la sección de fotobiorreactores

3.9 Operación del fotobiorreactor con suministro de CO₂ a nivel planta piloto

3.9.1 Densidad celular y pH de *Chlorella spp.*

La figura 3.26 muestra la curva de crecimiento de *Chlorella spp.* en el fotobiorreactor airlift durante 60 días de operación a 4000 lux y suministro de 2% CO₂. Se puede observar la fase de adaptación de la microalga durante los primeros 10 días, alcanzando subsecuentemente un máximo crecimiento de 2.1×10^7 cel/mL en el día 31. Robles *et al.* (2016) reportaron el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor airlift de 1.18×10^7 cel/mL en un periodo de 4-6 días.

El atraso para alcanzar el máximo crecimiento en el presente estudio es atribuido a un pronto suministro de CO₂ durante la fase de adaptación cuando la densidad celular se encontraba bajo (2.56×10^4 cel/mL), las células de la microalga no eran capaces todavía de desarrollar el proceso de fotosíntesis. Además, la solubilidad del CO₂ suministrado provocó un pH bajo de 5.81. Estos resultados son similares a los obtenidos por Choix *et al.* (2018) quienes reportaron un valor de pH de 5.60 en un cultivo de *Chlorella sp.* Esto ocurre cuando el CO₂ se disuelve en el agua produciendo iones de carbonato y bicarbonato. Cuando el valor del pH es arriba de 6.3, el carbono inorgánico es estabilizado en la forma de iones bicarbonato.

Debido a que el CO₂ puede difundirse libremente dentro y fuera de la solución acuosa, la mayor concentración de CO₂ disuelto en el agua disminuirá el valor del pH y esto resultará en una disminución de la actividad carbónica extracelular y finalmente inhibirá el crecimiento de las microalgas. Por lo tanto, un suministro adecuado de concentración de CO₂ para el cultivo de microalgas en la fase de registro puede enriquecer su contenido de carbono para aumentar la producción de biomasa (Xia *et al.* 2015).

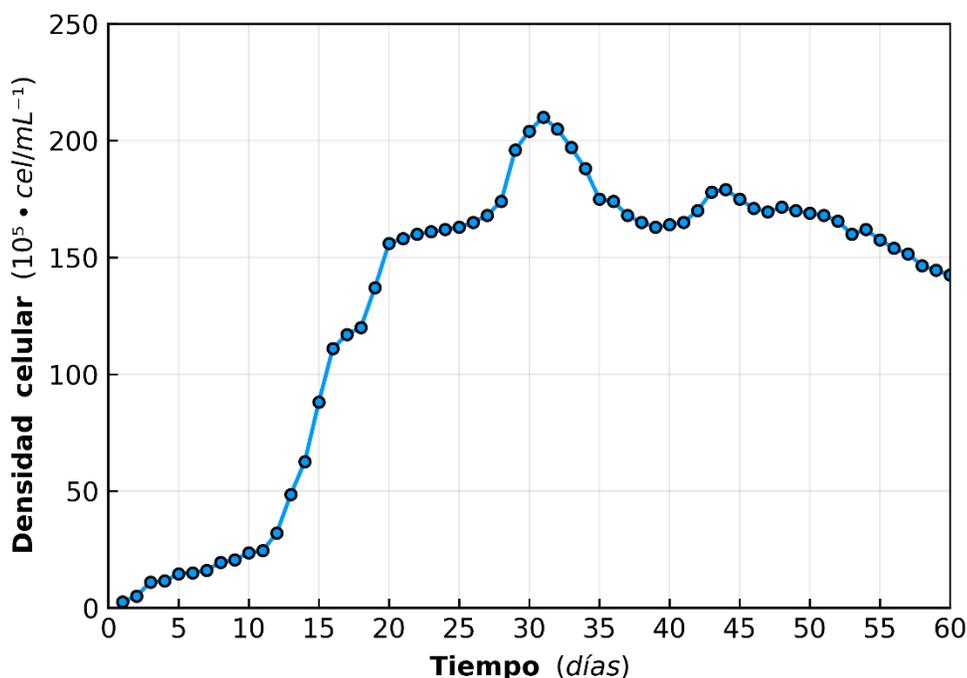


Figura 3.27 Curva de crecimiento de *Chlorella spp.* en el fotobiorreactor

El comportamiento dinámico del pH se muestra en la Figura 3.27, donde el CO_2 aparece como H_2CO_3 , HCO_3^- o CO_3^{2-} en el agua, según el valor del pH. Una alta concentración de CO_2 en el agua resultaría en una disminución del pH debido a la formación de ácido carbónico (Wong *et al.*, 2013). El valor de pH inicial se redujo rápidamente en el día 10, que fue proporcional a la concentración de suministro de CO_2 . A medida que se produjo la asimilación de CO_2 por las microalgas, el valor del pH aumentó debido al agotamiento del CO_2 ; cuando el bicarbonato es la única fuente de carbono, el pH del cultivo aumenta (Rost *et al.*, 2013). Este efecto se puede observar en el día 33 (Fig. 3.26) debido a que el cultivo de microalga estaba en la fase logarítmica y el pH aumentó hasta que alcanzó un comportamiento estable.

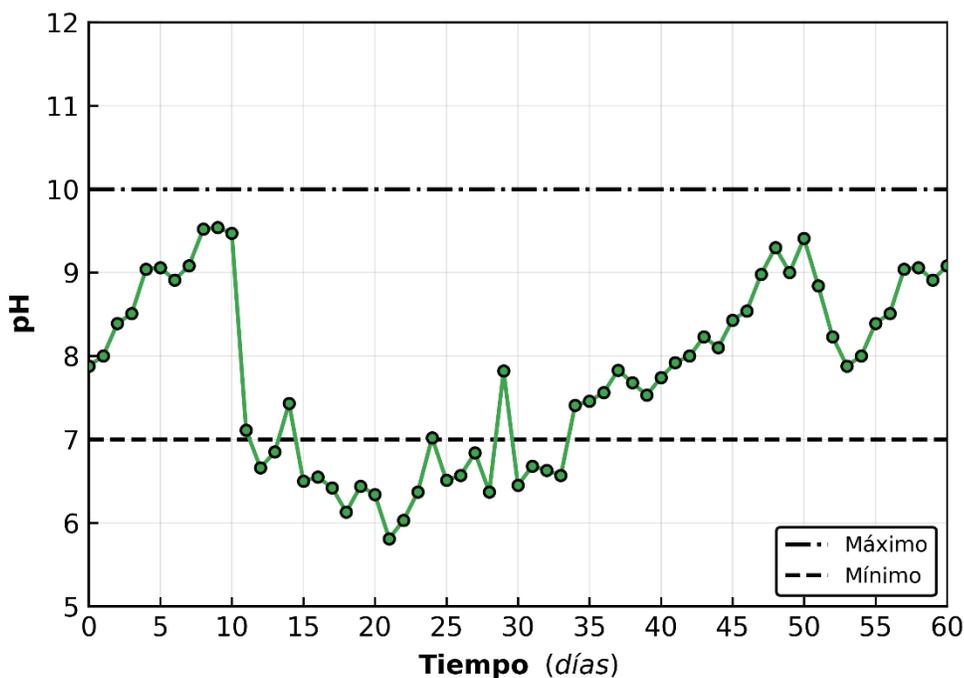


Figura 3.28 Comportamiento de pH en el fotobiorreactor

3.9.2 Producción de biomasa y tasa de fijación de CO_2

La actividad fotosintética y las tasas de crecimiento de las microalgas están limitadas por los ciclos de luz proporcionados a los cultivos. Así, Li *et al.* (2010) informaron que las variaciones en la productividad volumétrica y el crecimiento celular se basan en los ciclos de luminosidad a los que

está expuesto el cultivo. Las tasas de fijación del dióxido de carbono están relacionadas con la energía que las células reciben durante los ciclos de luz.

La tabla 3.13 muestra que la producción de biomasa de *Chlorella spp.* en el fotobiorreactor se obtuvo una concentración máxima de 2.18 g/L. Estudios similares han sido publicados previamente sobre especies relacionadas. Tejeda *et al.* (2015) informaron que *Chlorella Vulgaris* obtiene valores de biomasa de 0.27 g/L y Chia *et al.* (2013) obtuvieron 0.84 g/L con *Chlorella vulgaris*.

Tabla 3.14 Producción de biomasa y tasa de fijación de CO₂ a 4000 lux

Microalga	Biomasa (g L ⁻¹)	Productividad máxima (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa de fijación CO ₂ (g L ⁻¹ d ⁻¹)
<i>Chlorella spp</i>	2.18	0.94	0.63

En estos estudios, *C. vulgaris* mostró una menor producción de biomasa en comparación con Agwa *et al.* (2014) que reportaron 2.47 g/L utilizando *Chlorella spp.* Esto demuestra que la microalga *Chlorella spp.* utilizada en el presente estudio tiene una capacidad de producción de biomasa congruente y ligeramente superior a la informada por los autores mencionados anteriormente.

La figura 3.28 muestra los porcentajes de CO₂ y O₂ en el fotobiorreactor. Hay un aumento de *Chlorella spp.* en la fase exponencial por el suministro de CO₂; la remoción de CO₂ (medida con análisis cromatográfico) muestra un valor máximo de 91.92% en el día 23 y una mayor producción de O₂ en el día 31 con 47.66%.

Chaudhary *et al.* (2018) y Shabani *et al.* (2016) informaron una eliminación de 76% y 84% de CO₂ respectivamente por *Chlorella vulgaris*, más baja que los valores obtenidos en esta investigación. Esta diferencia se puede atribuir a que las diferentes condiciones de crecimiento de cada microalga y la eficiencia de la eliminación de CO₂ depende de cada especie en estudio.

Además, la fijación puede deberse a las condiciones fisiológicas de las microalgas, como el potencial de crecimiento celular y la capacidad de metabolizar el CO₂. Según Rodas *et al.* (2016), la productividad de la biomasa se ve afectada por varios factores, como la concentración de

nutrientes, la intensidad de la luz, el suministro de CO₂ y los medios de cultivo. Estos factores influyen en el crecimiento y composición de la biomasa producida.

La tasa de fijación de CO₂ de la microalga *Chlorella spp.* se evaluó en el fotobiorreactor, el mejor resultado obtenido fue de 0.63 g/L d en el día 32, Shabani *et al.* (2016) reportaron 0.67 g/L d por *Chlorella spp.* Por otra parte, García (2014) obtuvo una tasa de fijación de CO₂ de 0.6 g/L d utilizando la microalga *Chlorella spp.*, estos resultados son muy similares a los obtenidos en esta investigación.

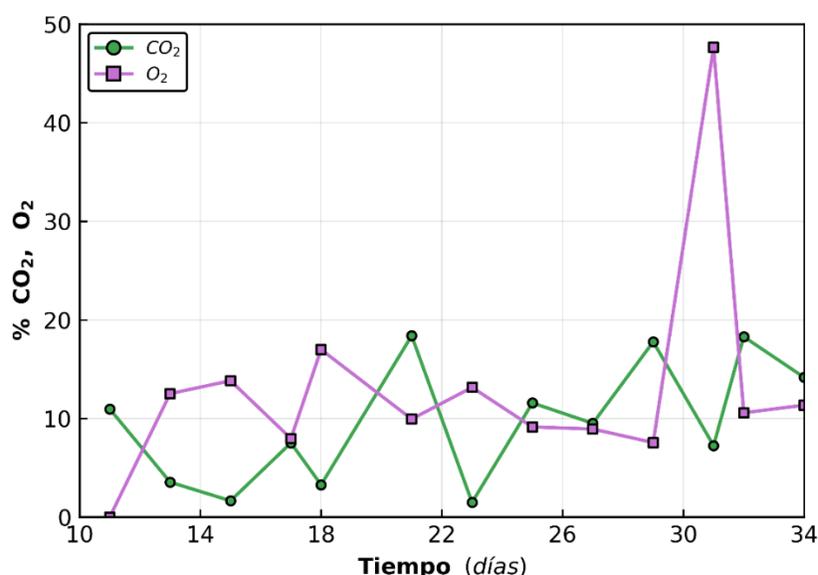


Figura 3.29 %Remoción de CO₂ y producción de O₂

3.9.3 Caracterización de biomasa de *Chlorella spp.*

La Tabla 3.14 muestra la caracterización de la biomasa de *Chlorella spp.* sin suministro de CO₂ y en las condiciones de los niveles recomendados (4000 lux y 2% de CO₂).

En este estudio, la producción de carbohidratos disminuyó con la adición de CO₂. Antes de suministrar CO₂ el contenido fue $173.4 \pm 2.3 \mu\text{g/mL}$ y $135 \pm 2.8 \mu\text{g/mL}$ después del suministro de CO₂. El mismo comportamiento fue reportado por Moreira (2016), quien encontró que en diferentes cultivos de microalgas, la concentración de carbohidratos era menor debido a la adición de CO₂.

La concentración de proteína más alta ($200 \pm 2,6$ mg/L) se obtuvo con un 2% de CO₂ en comparación con el valor de $138 \pm 1,4$ mg/L sin suministro de CO₂. Resultados similares fueron encontrados por Barajas *et al.* (2012) quien informó que *Chlorella Vulgaris* tenía una producción total de proteínas de 150 mg/L a 280 mg/L. El análisis de la composición química de *Chlorella spp.* muestra una relación inversa entre el contenido de proteínas y carbohidratos. Se obtuvieron niveles más altos de proteína y niveles más bajos de carbohidratos para las microalgas cultivadas con 2% (v/v) de CO₂. Wong *et al.* (2013) reportaron que el suministro de CO₂ aumentó el contenido de proteínas y disminuyó el contenido de carbohidratos.

El contenido de lípidos disminuyó cuando la microalga *Chlorella spp.* fue aireada con 2% de CO₂ obteniendo valores de $14.56 \pm 1.8\%$. Esto se contrasta con el valor de $16.1 \pm 2\%$ obtenido sin suministro de CO₂. Sin embargo, el contenido de lípidos en las células cultivadas al 2% de CO₂ y sin suministro de CO₂ fue muy similar. De acuerdo con Cheng *et al.* (2017), el contenido de lípidos de *Chlorella fusca* y *Phaeodactylum tricornutum* aumentó cuando las células se cultivaron en concentraciones más altas de CO₂.

El resultado presentado no fue consistente con estudios previos. Estos resultados divergentes para el contenido de lípidos de las microalgas cultivadas bajo suministro de CO₂ pueden deberse a las diferencias en las especies de microalgas, el contenido del medio de cultivo y las condiciones de cultivo.

Tabla 3.16 Caracterización de biomasa de *Chlorella spp.*

<i>Chlorella spp.</i>	Proteínas (mg L ⁻¹)	Lípidos (%)	Carbohidratos (µg/mL)
Sin suministro de CO ₂	138 ± 1.4	16.1 ± 2	173.2 ± 2.3
(4000 lux, 2% CO ₂)	200 ± 2.6	14.56 ± 1.8	135 ± 2.8

3.10 Contradicciones en fotobiorreactores airlift

Como parte de un proceso integral del tratamiento de digestión anaerobia, se acopló la sección de fotobiorreactores para la absorción de las corrientes de CO₂. Los fotobiorreactores presentan contradicciones físicas, las cuales se describen a continuación y representan los conflictos sobre los que es posible emplear las herramientas de TRIZ:

- Es necesario que las microalgas se reproduzcan de manera eficiente para lograr la absorción del CO₂, pero a su vez la densidad celular no debe ser excesiva que impida el paso de la luz al cultivo.
- El riser del fotobiorreactor debe ser pequeño para que haya circulación interna del cultivo, pero lo suficientemente largo para que el tiempo de residencia del CO₂ sea mayor.
- Las paredes del down comer deben ser gruesas para soportar el proceso, pero a su vez delgadas para permitir el paso de la luz al cultivo.
- El down comer debe estar cerrado en un instante de tiempo para llevar a cabo el proceso, pero abierto para liberar O₂ (presión).
- La velocidad del proceso (recirculación) debe ser lenta para no dañar la pared celular de las microalgas, pero la necesaria (rápida) para evitar la sedimentación.
- El fotobiorreactor ideal es aquel que en sus paredes no presentan adherencias de microalgas durante el proceso de cultivo.
- Al aumentar la velocidad de recirculación se disminuye la adherencia, pero exceso de velocidad daña las microalgas lo que provoca que no se lleve a cabo la absorción de CO₂.

Las contradicciones físicas se resuelven mediante los principios de separación. Los siguientes puntos ofrecen una breve descripción de estas estrategias de solución:

1. Separación en el espacio: Cuando un sistema debe ejecutar funciones mutuamente excluyentes u operar bajo condiciones contradictorias, debe intentarse fraccionar al sistema (en subsistemas), de modo tal que las funciones contradictorias puedan ser satisfechas con sub-sistemas diferentes.
2. Separación en el tiempo: Si un sistema debe satisfacer requerimientos contradictorios, funciones mutuamente excluyentes o funcionar bajo condiciones opuestas, debe tratar de

secuenciar las operaciones realizadas por el sistema, de manera tal que las exigencias, funciones u operaciones sean realizadas en intervalos de tiempo diferentes.

3. Separación bajo condiciones: Este tipo de contradicción se observa cuando uno de los estados o funciones del sistema es eficaz cuando está presente una cierta condición en el sistema y desaparece o pierde su eficiencia cuando esta condición cambia. Una vía de solución para este tipo de conflictos consiste en tratar de cambiar el sistema o el ambiente que le rodea con la finalidad de crear las condiciones necesarias para que el proceso deseado se realice. Es decir, es el propio medio ambiente el que realiza la acción deseada en el sistema.
4. Separación entre el sistema y sus partes: Si dos requerimientos mutuamente excluyentes son exigidos en un subsistema, la separación entre el sistema y sus componentes se puede emplear, sólo si un requerimiento existe al nivel del subsistema pero desaparece a un nivel sistémico inferior o superior.

El principal problema dentro del fotobiorreactor es la adherencia de las algas a las paredes. Los siguientes puntos ofrecen una serie de direcciones que deberán ser investigadas en un trabajo futuro.

Separación en el tiempo: hacer el flujo pulsante. En un momento hay mucho flujo y turbulencia. Posteriormente se detiene para volver a comenzar nuevamente. Esto genera los siguientes cuestionamientos: ¿A qué intervalo se debe disparar el fluido?, ¿Qué velocidad es la adecuada? Igualmente, es necesario evaluar la posibilidad de evitar la adhesión en las paredes del reactor mediante un impulso ultrasónico que incide en las paredes durante ciertos intervalos de tiempo.

Separación en el espacio: Con la finalidad de disminuir la adherencia, se sugiere multiplicar los puntos de entrada y salida de agua, así se acelera el flujo y se logra mantener una mayor velocidad de fluido. Además es posible hacerla pulsante. Pregunta: a qué velocidad se debe mantener el fluido para evitar que se dañe el microorganismo?

Separación bajo condiciones: el movimiento del fluido por si mismo reduce la adherencia en las paredes. La idea es utilizar el movimiento del fluido para hacer funcionar un mecanismo interno de limpieza. Un objeto se desplaza al interior del reactor y por fricción elimina la adherencia. El

mecanismo para mover el objeto es mediante un sistema de engrane el cual que mueve constantemente el objeto y produce la función útil. El reactor se queda tal cual en su configuración actual, pero se adiciona un subsistema.

Separación entre el todo y sus partes: se coloca al interior un objeto para limpiar con propiedades magnéticas y al exterior un magneto que lo sujeta. Se limpia de manera mecánica el interior del bioreactor.

Otra línea de investigación consiste en la utilización de recursos: el microorganismo tiene carga iónica. Utilizar un campo de fuerza que lo mantenga alejado de la superficie. Pregunta: ¿Qué mecanismo emplea el alga para adherirse a la pared del reactor? Estos organismos se encuentran en un medio acuoso, por lo tanto tendrán una carga ionica particular. La pregunta en consecuencia es: Puede utilizarse esta carga ionica para mantener limpias las paredes del bioreactor?

Con respecto al concepto de sistema ideal, se propone la siguiente formulación: El fotobiorreactor ideal es aquel que en sus paredes no presentan adherencias de microalgas durante el proceso de cultivo y permite el paso adecuado de la luz.

3.11 Estrategias de operación de fotobiorreactores

Finalmente, los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que las dos especies de microalgas utilizadas son una buena fuente de pigmentos y nutrientes además de ser capaces de remover el dióxido de carbono proveniente de la combustión del biogás, dependiendo del propósito y uso final de cada especie se pueden establecer las siguientes estrategias de operación:

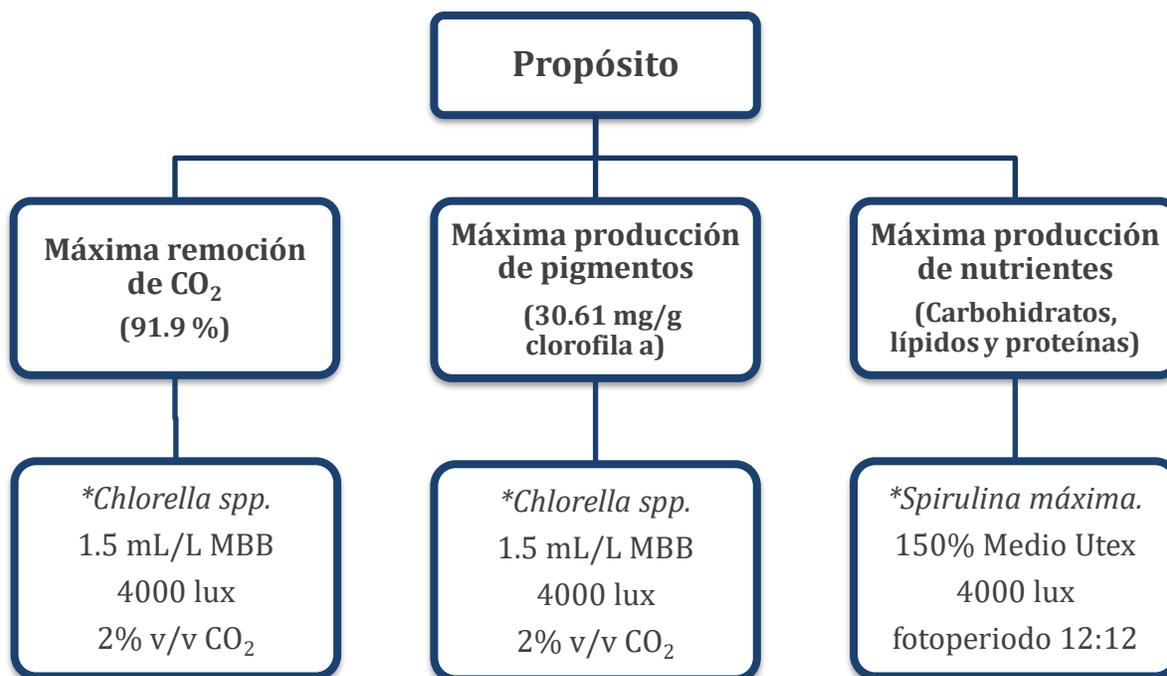


Figura 3.30 Estrategias de operación de fotobiorreactores

Como se observa en la figura 3.29, siendo el objetivo principal la remoción de CO_2 o la obtención de pigmentos se debe de utilizar la especie *Chlorella spp.* con dosis de 1.5 mL/L de medio de cultivo Bold Basal bajo las condiciones de 4000 lux de intensidad y suministro de 2% v/v de CO_2 .

Por otra parte, si el objetivo principal es la obtención de biomasa como fuente de nutrientes se debe de utilizar la especie *Spirulina máxima* con dosis de 150% de medio de cultivo Utex e intensidad luminosa de 4000 lux con fotoperiodos de 12:12 h.

3.12 Análisis bioquímico del proceso de absorción de CO_2

El mecanismo de absorción de CO_2 realizado por las microalgas cumple una función vital para la vida en el planeta y se puede describir de la siguiente manera:

La fotosíntesis es el proceso más importante en el metabolismo de las microalgas. Estas utilizan la energía solar para metabolizar el dióxido de carbono (CO_2) a metanal (CH_2O) liberando oxígeno

molecular (O_2). Las moléculas de CH_2O constituyen los bloques responsables de la formación de moléculas de glucosa en las microalgas.

La microalga *Chlorella spp.* cultivada con suministro de CO_2 proveniente del biogás del proceso de digestión anaerobia de lodos residuales con control de flujo al 2% v/v y con nutrientes a 1.5 mL/L de medio Bold Basal bajo la máxima intensidad luminosa controlada artificialmente a 4000 lux para poder absorber cantidades superiores de CO_2 de las que normalmente se encuentran en la naturaleza, demostrando experimentalmente que se puede aumentar la eficiencia de fijación de CO_2 hasta un 91.92%.

En este proceso de fotosíntesis el CO_2 se metaboliza a compuestos orgánicos como azúcares utilizando una fuente de iluminación que es absorbida por los pigmentos de la microalga (clorofilas) para iniciar el proceso de quimiosíntesis y metabolizar el CO_2 en glucosa.

Este mecanismo se puede observar en las figuras 3.30 y 3.31.

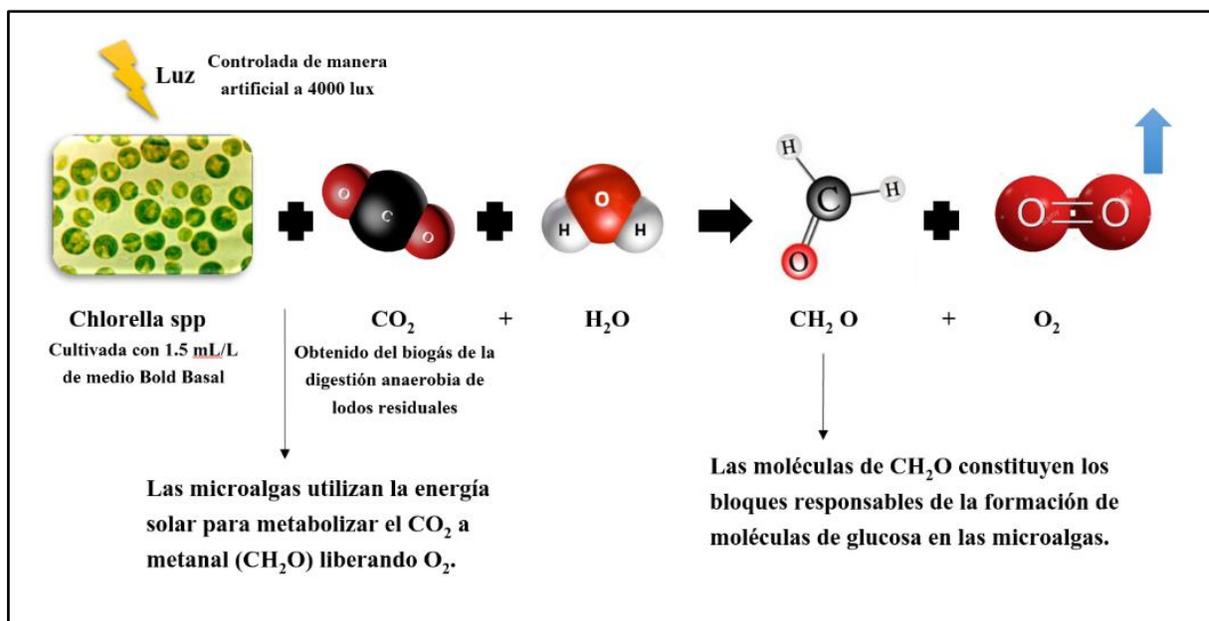


Figura 3.31 Mecanismo bioquímico de absorción de CO_2

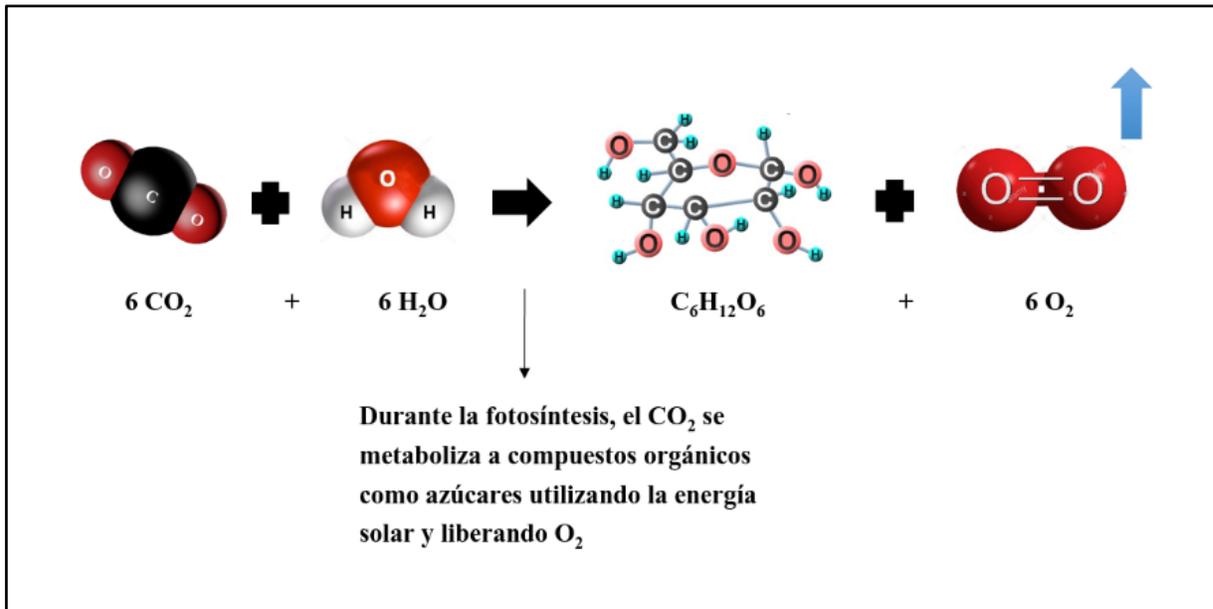


Figura 3.31 Absorción de CO_2



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

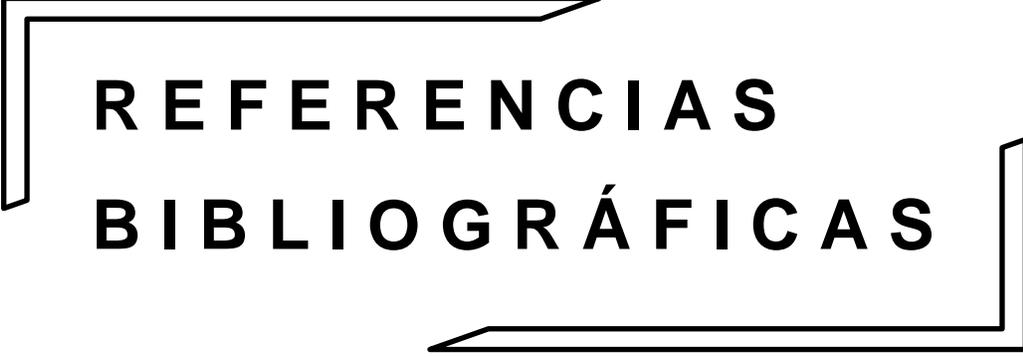
Los resultados del presente estudio impactan al desarrollo científico y tecnológico de México ya que los procesos estudiados representan alternativas viables para la solución de problemas reales a escala industrial.

- ❖ Se logró determinar la dosis de MBB adecuada para un favorable crecimiento celular de la microalga *Chlorella spp.* la cual fue de 1.5 mL/L de medio se obtuvo un valor máximo de crecimiento celular de 7.10×10^7 cel/mL. Para *Spirulina máxima* dosis de 150% de medio Utex y crecimiento de 1.81×10^6 cel/mL.
- ❖ Se evaluó la tasa de crecimiento celular y el tiempo de duplicación de la microalga *Chlorella spp.*, ya que proporciona información importante de crecimiento. En el presente estudio se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de $1.99 \approx 2$ divisiones de células por día y un tiempo de duplicación de 0.34 días^{-1} .
- ❖ El pH monitoreado durante este proyecto se mantuvo en un rango de 6.25–9 en la microalga *Chlorella spp.* y de 8.0-10.43 para *Spirulina máxima*, ambas especies se mantuvieron dentro de los límites tolerables de pH.
- ❖ El valor obtenido de biomasa seca en la dosis de 1.5 ml fue de 0.612 g/L y los resultados arrojados en dichas pruebas con la dosis 1.5 fueron los siguientes: clorofila totales 24.89 mg/L, lípidos con valor promedio final 20.8 g/100g biomasa, carbohidratos con un valor final de 545.64 mg/L y proteínas con un resultado promedio de 201.53 mg/mL.
- ❖ De acuerdo a los resultados de ANOVA obtenidos en el diseño 3^2 , el suministro de CO_2 no influye significativamente sobre el crecimiento de la microalga *Chlorella spp.*, mientras que el término luminosidad fue significativo sobre la variable de respuesta. La microalga fue capaz de crecer adecuadamente con un suministro de gas del 2% v/v y una iluminación de 4000 lux con lo cual obtuvimos un crecimiento celular satisfactorio de 5.44×10^7 cel/mL.
- ❖ Tanto la microalga *Chlorella spp.* como *Spirulina máxima* presentan un comportamiento no newtoniano, con características de fluido tipo dilatante dentro de la gama de valores

utilizados para la velocidad de deformación y la concentración de biomasa. Este comportamiento está presente en los medios que son ricos en biomasa.

- ❖ Con los resultados obtenidos de las propiedades reológicas, se comprobó que existe una viscosidad y un esfuerzo de corte para cada crecimiento celular, con lo cual se logró establecer un gráfico representativo para la correlación entre el índice de comportamiento de flujo y la densidad celular del cultivo como contribución al conocimiento científico con $R^2=0.976$.
- ❖ El pH monitoreado en estas cinéticas se mantuvo en un rango de 7 – 10 para el efecto de la adición de CO_2 , con eso se concluye que la microalga *Chlorella spp.*, tiene la capacidad de tolerar un rango amplio de pH con un crecimiento satisfactorio.
- ❖ Se establecieron las condiciones para la máxima obtención de nutrientes en la microalga *Spirulina máxima* las cuales fueron: 150% de nutrientes en el medio de cultivo Utex, intensidad luminosa de 4000 lux y fotoperiodos de operación de 12:12 h luz:oscuridad.
- ❖ Finalmente se obtuvieron las mejores condiciones para la máxima producción de pigmentos, fijación de CO_2 y obtención de O_2 las cuales fueron: dosis 1.5 ml MBB, iluminación de 4000 Lux y un suministro de CO_2 al 2% v/v. Con estas condiciones se cultivó la microalga *Chlorella spp.* en el fotobiorreactor tubular a escala piloto diseñado en el presente proyecto de investigación, logrando así la fijación máxima de CO_2 hasta un 91.92%.
- ❖ Como parte de un proceso integral para combatir los gases de efecto invernadero, se estudió la mitigación del CO_2 que se genera en los procesos de combustión para obtener bioenergía mediante digestión anaeróbica. El proceso de mitigación de CO_2 se puede implementar en el proceso de digestión anaeróbica de lodos u otros desechos orgánicos, así como en una amplia variedad de procesos que deben estudiarse para evitar la emisión de dióxido de carbono a la atmósfera.
- ❖ El estudio muestra que *Chlorella spp.* cultivado en un FBR tipo airlift tiene el máximo crecimiento y mitigación de CO_2 a 4000 lux y 2% de CO_2 . Por lo tanto, *Chlorella spp.* es una buena opción para mitigar el CO_2 de los gases de combustión.

- ❖ Debido al alto contenido de macronutrientes (carbohidratos, lípidos, proteínas) que se encuentran en la biomasa, la microalga representa una valiosa materia prima para varias industrias farmacéuticas y de nutrición.
- ❖ Los resultados de este estudio representan alternativas viables para reducir los efectos ambientales negativos causados por la emisión de CO₂ a la atmósfera.
- ❖ Finalmente, los esfuerzos deben dirigirse hacia la producción de microalgas a gran escala, así como hacia la evaluación de otros géneros de microalgas debido a la gran diversidad y potencial biotecnológico de cada cepa de microalgas.
- ❖ El uso de ésta tecnología de tipo airlift del fotobiorreactor promueve la mejora del crecimiento poblacional de las microalgas y su aprovechamiento para la remoción de CO₂ y obtención de biomasa.



REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abalde, J. E. 1995. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. Editorial Universidad de da Coruña, España. Págs. 114-147

Afonso, A., Ojeda, A., Dolores, S. Efectos de la salinidad, luz y temperatura en el crecimiento del alga fitoplanctónica *Chlorella sp.* Informes técnicos del Instituto Español de Oceanografía, **1985**. España.

Agwa, O.K.; Ibe, S.N.; Abu, G.O. Biomass and lipid production of a fresh water algae *Chlorella sp.* using locally formulated media. International Research Journal of Microbiology. **2014**, 3(9), 288-295.

Altshuller G. (2007). The Innovation Algorithm. Worcester, Massachusetts: Technical Innovation Center.

Alvear, M., Castillo, C., & Henao, D. Evaluacion del pH y concentracion de nitrogeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chorella nativa* como fuente de aceite vegetal ara la produccion de biodisel. **2011**. *Universidad de Cartagena*.

Band, S.C. J. Generación biotecnológica para la producción de microalgas. *Ciencia y Mar*. **1997**. 1(1): 23-30.

Barajas, S. A. F.; Godoy, R. C. A.; Monroy, D. J. D.; Barajas, F. C.; Kafarov, V. Improvement of CO₂ sequestration by *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 on lab scale photobioreactors. *Rev. Ion*. **2012**, 25(2): 39-47.

Barajas Solana, A. F., Godoy Ruiz, C. A., Monroy Davila, J. D., Barajas Ferreira, C., & Kafarov, V. Mejoramiento del secuento de CO₂ por *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en fotobiorreactor a escala laboratorio. *Revista ION*. **2012**. 39-47.

Bahret, M., Chaves, J., Courts, G. y D'alessio, N. (1992). *Biología*. Prentice Hall, pag, 274-278.

Barrientos, M. R. C. 2005. La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la península de Yucatán. Ediciones de la universidad Autónoma de Yucatán, México.

Brix, Jacob. Exploring knowledge creation processes as a source of organizational learning: A longitudinal case study of a public innovation project. *Scandinavian Journal of Management*. **2017**, 33, 113-117.

Caballero, G.M. Desarrollo del proceso de bioconversión del CO₂ contenido en biogás a O₂ y biomasa a partir de microalgas. Tesis de Maestría. **2013**. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Camacho-Rodríguez, J.; Cerón-García, M.C.; Fernández-Sevilla, J.M.; Molina-Grima, E. The influence of culture conditions on biomass and high value product generation by *Nannochlorosis gaditana* in aquaculture. *Algal Research*. **2015**, 11, 63-73.

Cañizares-Villanueva, R.O., Martínez-Roldán, A., Perales-Vela, H., Torzillo, G. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas y las cianobacterias: cultivo, bioproductos y bioenergéticos. **2013**. CINVESTAV IPN. Manual de prácticas.

Catzim C. L., López A. S. 2011. Microalgas dulce acuícolas. Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán.

Chaudhary, R.; Wah, Y.; Kumar, A. Kinetic study of nutrients removal from municipal wastewater by *Chlorella vulgaris* in photobioreactor supplied with CO₂-enriched air. *Environmental Technology*. **2018**, In Press.

Cheng, D.; Li, D.; Yuan, Y.; Zhou, L.; Li, X.; Wu, T.; Wang, L.; Zhao, Q.; Wei, W.; Sun, Y. Improving carbohydrate and starch accumulation in *Chlorella* sp. AE10 by a novel two-stage process with cell dilution. *Biotechnology for Biofuels*. **2017**, 10:75 2-14.

Chia, M.A.; Lombardi A.T.; Melao, M. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. **2013**, 4, 1427-1438.

Chioccioli, M.; Hankamer, B.; Ross, I. L. Flow Cytometry Pulse Width Data Enables Rapid and Sensitive Estimation of Biomass Dry Weight in the Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*. PLoS ONE 9(5): e97269. **2014**, DOI:10.1371/journal.pone.0097269

Choix, F. J.; Ochoa, M. A.; Hsieh, M.; Mondragon, P.; Mendez, H. O. High biomass production and CO₂ fixation from biogas by *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae using tequila vinasses as culture medium. Journal of Applied Phycology. **2018**, <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1433-2>.

Contreras, F.C., Peña C. J. M., Flores C. L. B. y Cañizares V. L. O. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Interciencia. **2013**, **28(8)**: 450-456.

Cristianini, M., & Silva, M. Determinación de los parámetros reológicos en suspensiones de *Chlorella* spp. Congreso brasileño de sistemas particulados. Universidad de Sao Carlos, **2015**, 1-8.

Da Silva Vaz, B.; Costa, J. A. V.; Greque de Morais, M. Innovative nanofiber technology to improve carbon dioxide biofixation in microalgae cultivation. Bioresource Technology. **2018**, In Press.

Da Neves, F. de F.; Hoinaski, L.; Rörig, L. R.; Derner, R. B.; de Melo Lisboa, H. Carbon biofixation and lipid composition of an acidophilic microalga cultivated on treated wastewater supplied with different CO₂ levels. Environmental Technology. **2018**. DOI:10.1080/09593330.2018.1471103

De Godos, I.; Blanco, S.; García-Encina, P.A.; Becares, E.; Muñoz, R. Influence of flue gas sparging on the performance of high rate algae ponds treating agro-industrial wastewaters. Journal of Hazardous Materials. **2014**, *179*, 1049–1054.

Dermirbas, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. Applied Energy. **2011**, *88* 5341-3547.

Demirbas A, Demirbas M.F. Algae energy: algae as a new source of biodiesel. London: **2010**. Springer-Verlag.

Domínguez, S. V. Evaluación del desempeño de *Chlorella spp.* y *Spirulina maxima* en el proceso de bioconversión de dióxido de carbono contenido en biogás a oxígeno y biomasa. Tesis de maestría. **2014**. Instituto Tecnológico de Orizaba, México.

Duarte, J.H.; de Morais, E. G.; Radmann, E. M.; Costa, J. A. V. Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina sp.* *Bioresource Technology*. **2017**, 234, 472–479.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **1956**, 28: 350–356.

Fang-Fang L., Zhong-Hua Y., Zeng R. Microalgae capture of CO₂ from actual flue gas discharged from a combustion chamber. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2015**, 50, 6496-6502.

Farrelly, D.J.; Everard, C.D.; Fagan, C.C.; McDonnell, K.P. Carbon sequestration and the role of biological carbon mitigation: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2013**, 21, 712-727.

Fiorineschi, L., Saverio, F., & Rotini, F. (2018). Enhancing functional decomposition and morphology with TRIZ: Literature review. *Computers in industry*, 1-15

Gairín, S.J., Fernández, M., Barrera, A., Rodríguez, D. Review of knowledge creation and management processes through communities of practice in public administration. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*. **2012**, 46, 2198-2204.

García-Cubero, R. Biomass production of microalgae rich in carbohydrates completed to the photosynthetic elimination of CO₂. Ph.D. Thesis. Universidad de Sevilla. España. 2014

García, R.L. Respuesta fotosintética del alga roja *Gracilaria sp.* e identificación molecular de dos fenotipos. Tesis de Maestría. **2009**. Instituto Politécnico Nacional. México.

Garduño, G., Godínez, J.L., Ortega, M. Distribución geográfica y afinidad por el sustrato de las algas verdes (*Chlorophyceae*) bénticas de las costas mexicanas del Golfo de México y Mar Caribe. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **2005**, 76: 61-78

Goncalves, A.L.; Simoes, M.; Pires, J.C.M. The effect of light supply on microalgal growth, CO₂ uptake and nutrient removal from wastewater. *Energy conversion and Management*. **2014**, 85, 530-536.

Gong, Q.; Feng, Y.; Kang, L.; Luo, M.; Yang, J. Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. *Energy Procedia*. **2014**, 61, 2012-2015.

González-López, C.V., Ación, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Molina, E. Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO₂. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal*. **2011**, 2(2):93-106.

Giordano, M.; Beardall, J.; Raven, J.A. CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*. **2015**, 56, 99–131.

Harun, R.; Singh, M.; Forde, G.M.; Danquah, M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2010**, 14, 1037-1047.

Hernández, A., Labbé, J.I. Microalgas, cultivo yy beneficios. *Revista de biología Marina y Oceanografía*. **2014**, 49, 157-173.

Herrera Yáñez, María B. Determinación de condiciones de operación de alto desempeño del proceso de fijación de CO₂ para su implementación en fotobiorreactores tubulares a escala piloto. Tesis de Maestría. **2014**. Tecnológico Nacional de México Campus Orizaba.

Horwitz, W. Association of Official Analytical Chemists. In *Official methods of Analysis of the AOAC*. No. Ed. 15; USA, **2010**; Vol. 2.

Huang, Q.; Jiang, F.; Wang, L.; Yang, C. Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. *Engineering*. **2017**, 3(3): 318-329.

Imoh M. Ilevbare, David Probert, Robert Phaal. 2013. A review of TRIZ, ans its benefits and challenges in practice. *Technovation*. **2013**. 33, 30-37.

Jacob-Lopes, E., Gimenes-Scoparo, C. H., Queiroz, M. I. y Teixeira-Franco, T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. *Energy Conversion and Management*. **2009**. 51: 894–900.

Jeffrey, S.W., and Humphrey, G.F. New Spectrophotometric equations for determining Chlorophylls a, b and c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemical Physiological Pflanzen*. **1975**. 167, 191-194.

Kasiri, S.; Ulrich, A.; Prasad, V. Optimization of CO₂ fixation by *Chlorella kessleri* cultivated in a closed raceway photo-bioreactor. *Bioresource Technology*. **2015**, 194, 144-155.

Khalil, Z.; Asker, M.M.; El-Sayed, S.; Kobbia, I.A. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World Journal Microbiol Biotechnol*. **2010**. 26, 1225-1231.

Kumar, K.; Banerjee, D.; Das, D. Carbon dioxide sequestration from industrial flue gas by *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource. Technology*. **2016**, 152, 225-233.

Lee, Y., & Tay, H. High CO₂ partial pressure depresses productivity and bioenergetics growth yield of *Chlorella pyrenoidosa* culture. *Journal of Applied Phycology*. **1991**. 15, 156-162.

Liao Q.; Li, Lin.; Chen, Rong.; Zhu, Xun. A novel photobioreactor generating the light/dark cycle to improve microalgae cultivation. *Bioresource Technology*. **2014**, 161, 186-191.

Li, E.; Mira de Orduña, R. A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyzer with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in Applied Microbiology*. **2010**, 50(3), 283-288.

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

López, L.A.; Martínez, S.; Corte, G.; Méndez, J.M. Influence of organic loading rate on methane production in a CSTR from physicochemical sludge generated in a poultry slaughterhouse. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. **2014**, 49, 1710-1717.

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

McAdam R. Knowledge creation and idea generation: a critical quality perspective. *Technovation*. **2004**. 24, 697-705.

Metz, Bert & Davidson, Ogunlade & de Coninck, Heleen & Loos, Manuela & Meyer, Leo. (2005). IPCC Special Report on Carbon dioxide Capture and Storage. Policy Stud..

Mora, R., Moronta, R., Ortega, J. y Morales, E. Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella sp.* aislada de la represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. 2014. *Revistas Científicas y Humanísticas*.

Moreira, J.B.; Terra, A.L.M.; Costa, J.A.V.; Morais, M.G. Utilization of CO₂ in semi-continuous cultivation of *Spirulina sp.* and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **2016**, 33(3), 691-698.

Montgomery, D.C. *Diseño y Análisis de Experimentos*. 2nd Ed.; Grupo Editorial Limusa Wiley S.A. de C.V.; México, **2014**; 45-222.

Muñoz, C., Peris, P. y Rodríguez. J. D. 2011. Estado del arte de las tecnologías de captura y almacenamiento de CO₂ en la industria del cemento. Asociación de fabricantes de cemento de España. España.

Nielsen, S.S. Total Carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid Method. In: *Food Analysis Laboratory Manual*. Food Science Text Series. Springer, Cham. **2017**.

NMX-AA-087-SCFI-2010. Water analysis-Test method. 2010, 34-35.

Ono, E., & Cuello, J. Selection of optimal species for CO₂ sequestration. *Second Annual Conference on Carbon Sequestration*. **2003**. 13, 145-156.

Ota, M.; Takenaka, M.; Sato, Y.; Smith, R.; Inomata, H. Effects of light intensity and temperature on photoautotrophic growth of a green microalga, *Chlorococcum littorale*. *Biotechnology Reports*. **2015**. 7, 24-29.

Peña, S. E. J., Palacios, P. M. L. y Ospina-Álvarez, N. 2005. Algas como indicadores de contaminación. Universidad del Valle programa Editorial. Colombia

Piedrahita, J. Diseño de sistema de alimentación y control de la temperatura en un fotobiorreactor para la producción de biomasa y ácidos grasos a partir del cultivo de la microalga *Chlorella Vulgairs*. **2012**. *Universidad Autónoma de Occidente*.

Pires, J.C.M.; Gonçalves, A.L.; Martins, F.G.; Alvim-Ferraz, M.C.M.; Simões, M, Effect of light supply on CO₂ capture from atmosphere by *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang*. **2013**, 1-9.

Plata, V., Kafarov, V., Moreno, N. Desarrollo de una metodología de transesterificación de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. **2013**. *Prospect*. Vol. 7, No. 2, págs. 35-41.

Plasencia, A. J. Cultivo de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) con iluminación mediante LEDs. Tesis de licenciatura. **2012**. Universidad Politécnica de Madrid. España.

PNUMA. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. <http://www.pnuma.org/> (Consultada agosto, 2018).

Raesossadati, M.J.; Ahmadzadeh, H.; McHenry, M.P.; Moheimani, N.R. CO₂ bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO₂ concentrations, light, and temperature. *Algal Resource*. **2014**, 6(Part A), 78-85.

Rantanen, K. & Domb, E. (2008). New problem solving applications for engineers and manufacturing professionals. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Rendón, L., Ramírez, M., & Vélez, Y. Microalgas para la industria alimentaria. **2015**. *Universidad Pontificia Bolivariana. Colombia*.

Richmond, A. Efficient utilization of high irradiance for production photoautotrophic cell mass: a survey. *Journal of Applied Phycology*. **1996**. 381-387

Robles, J. C.; Sacramento, J. C.; Ruiz, A.; Baz, S.; Canedo, Y.; Narváez, A. Evaluation of cell growth, nitrogen removal and lipid production by *Chlorella vulgaris* to different conditions of aeration in two types of annular photobioreactors. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, **2016**, 15(2), 361-377

Rodas, H.A.; Rodriguez, H.; Luna, A.I.; Alcala, J.; Vidales, J.A.; Flores, H. Biomass production and quality estimation of *Chlorella vulgaris* (CLV2) under large scale production conditions. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, **2016**, 4(5), 493-498.

Romo P, A. K.. Manual para el cultivo de microalgas. Memoria técnica de un trabajo profesional. **2002**. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México.

Rost, B.; Riebesell, U.; Burkhardt, S.; Sultemeyer, D. Carbon acquisition of bloom-forming marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*. **2013**, 48, 55-67.

Salamatov, Y. (1999). TRIZ: the Right Solution at the Right Time: A Guide to Innovative Problem Solving. Krasnoyarsk, Russia: Institute of Innovative Design.

Sánchez, L. Cultivo a la intemperie de *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobiorreactor solar "air-lift". Tesis de maestría. **2013**. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Savransky, S. (2000). Engineering of Creativity: Introduction to TRIZ Methodology of Inventive Problem Solving. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Semarnat, 2016. Indicadores básicos del desempeño ambiental en México. http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/indicadores12/conjuntob/01_atmosfera/01_introduccion.html. (Consultada Abril, 2016).

Shabani, M.; Sayadi, M.H.; Rezaei, M.R. CO₂ bio-sequestration by *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* in response to different levels of salinity and CO₂. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*. **2016**, 6(2), 53-61.

Shabnam, S., R.G. Development of photobioreactors for improvement of algal biomass production. *International Journal of Scientific Research*. **2015**, 50, 324-329.

Shames, I. (1995). *Mecánica de Fluidos*. Santa Fé de Bogotá: McGraw Hill.

Siddiqui, S.; Rameshaiah, G.N.; Kavya, G. Development of photobioreactors for improvement of algal biomass production. *International Journal of Scientific Research*. **2015**, 4(1), 220-225.

Singh, R.N.; Sharma, Shaishav. Development of suitable photobioreactor for algae production –A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2012**, 16, 2347-2353.

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.* **2009**. 13(3) ISSN 0188-4786

Stefan Hüsing, Stefan Kohn. 2011. "Open CAI 2.0"-Computer Aided Innovation in the era of open innovation and Web 2.0. *Computers in Industry*. **2011**. 62, 407-413.

Sushkov, V.V.; N. J. I. Mars & P. M. Wognum. 1995. Introduction to TIPS: a theory for creative design. *Artificial Intelligence in Engineering*. **1995**. 9, 177-189.

Tejeda, L.; Argumedo, D.H.; Alvear, M.; Saldarriaga, C.R. Characterization and lipid profile of oil from microalgae. *Facultad de Ingeniería*. **2015**, 24(39), 43-54.

Triana, S. F. C. 2006. Evaluación del pH en el cultivo de *Spirulina* spp. (*Arthrospira*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.

Vasquez-Villalobos, V., Vergaray, D., Suarez, S., Valladares, J., Zamora, A., Gaspar, K., & Escurra, X. Influencia de la proporción agua de mar y bicarbonato en la producción de biomasa de *Spirulina* sp. con iluminación de diodo emisor de luz. *Scientia Agropecuaria*, **2014**, 5(4), 199-209

Vinodh, S., Kamala, V., Jayakrishna, K. Integration of ECQFD, TRIZ and AHP for innovative and sustainable product development. *Applied Mathematical Modelling*. **2014**, 38, 2758–2770.

Walker, J.M. The Lowry Method for protein quantitation. In *The protein Protocols Handbook*. Springer; **2002**. 1146 p.

Wang, B.; Lan, C.Q.; Horsman, M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advance*. **2012**, 30(4), 904–912.

Ward, A.J.; Lewis, D.M.; Green, F.B. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*. **2014**, 5, 204-214.

Wong, Y.K.; Ho, C.; Lai, P.K.; Leung, C.; Ho, Y.M.; Lee, O.K.; Leung, H.M. A Study on Algal Growth Behaviour under Different Sparging Period of CO₂ Supplementation. Conference Paper: 1st International Conference on Beneficial Uses of Algal Biomass (ICBUAB), Hong Kong, 2013.

Xia, J.R.; Gao, K.S. Impacts of elevated CO₂ concentration on biochemical composition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater green microalgae. *Journal of Integrative Plant Biology*. **2015**, 47, 668-675.

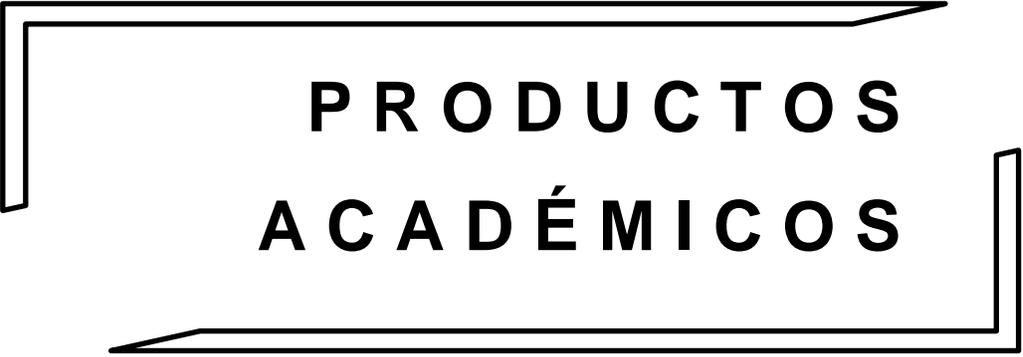
Yang, C., Chen, J. Accelerating preliminary eco-innovation design for products that integrates case-based reasoning and TRIZ method. *Journal of Cleaner Production*. **2011**, 19, 998-1006.

Yuan-Chen, X.; Vinh-Thang, H.; Avalos-Ramirez, A.; Rodrigue, D.; Kaliaguine, S. Membrane gas separation technologies for biogas upgrading. *Royal Society of Chemistry Advances*. **2015**, 5, 24399-24448.

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

Zhou, W.; Wang, J.; Chen, P.; Ji, C.; Kang, Q.; Lu, B.; Li, K.; Liu, J.; Ruan, R. Bio-mitigation of carbón dioxide using microalgal systems: Advances and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2017**. 76, 1163-1175.

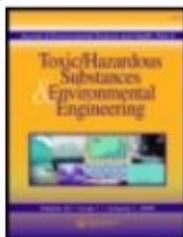
Zúñiga, A.R. Reduction of Carbon Footprint by means of *Chlorella* sp. cultures in photobioreactors. *Journal of Technological Possibilism*. **2013**, 2(3): 2013



**PRODUCTOS
ACADÉMICOS**

PRODUCTOS ACADÉMICOS

1)



Journal of Environmental Science and Health, Part A
Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering



ISSN: 1093-4529 (Print) 1532-4117 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/lesa20>

Mitigation of greenhouse gases (CO₂) generated in the anaerobic digestion of physicochemical sludges using airlift photobioreactors operated with *Chlorella* spp.

Margarita Caballero-García, Guillermo Cortés-Robles, María Betsabé Herrera-Yáñez, Alejandro Alvarado-Lassman & Juan Manuel Méndez-Contreras

To cite this article: Margarita Caballero-García, Guillermo Cortés-Robles, María Betsabé Herrera-Yáñez, Alejandro Alvarado-Lassman & Juan Manuel Méndez-Contreras (2019): Mitigation of greenhouse gases (CO₂) generated in the anaerobic digestion of physicochemical sludges using airlift photobioreactors operated with *Chlorella* spp., Journal of Environmental Science and Health, Part A, DOI: [10.1080/10934529.2018.1562809](https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1562809)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1562809>



Published online: 19 Jan 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 27



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=lesa20>



Mitigation of greenhouse gases (CO₂) generated in the anaerobic digestion of physicochemical sludges using airlift photobioreactors operated with *Chlorella* spp.

Margarita Caballero-García, Guillermo Cortés-Robles, María Betsabé Herrera-Yáñez, Alejandro Alvarado-Lassman , and Juan Manuel Méndez-Contreras

División de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México/Orizaba, Orizaba, Mexico

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the mitigation of greenhouse gasses generated in the anaerobic digestion process of physicochemical sludges by evaluating the effect of CO₂ supply and light intensity requirements on the growth of microalga *Chlorella* spp. and measuring the consumption of CO₂. The best conditions at a laboratory scale were performed in an airlift photobioreactor (PBR) at pilot-scale plant (26 L) during 60 days with a CO₂ supply of 2% v v⁻¹ from an electric generator coupled to an anaerobic digestion of physicochemical sludge process. The maximum %CO₂ consumed was 91.92% which was reached in the seventh supply cycle and biomass production was 2.18 g L⁻¹. The results obtained showed that airlift-type PBRs are a suitable complement for anaerobic digestion of physicochemical sludge technologies in order to reduce emissions of greenhouse gases produced during the combustion of biogas.

ARTICLE HISTORY

Received 30 May 2018
 Accepted 17 December 2018

KEYWORDS

Anaerobic digestion;
Chlorella spp.; CO₂ removal;
 greenhouse gases
 mitigation; photobioreactor

Introduction

The atmospheric concentration of greenhouse gases (GHGs) has been significantly increased. This is mainly caused by anthropogenic activities such as fossil fuel burning, deforestation, biomass burning, etc.

Carbon dioxide represents 68% of GHGs emission into the atmosphere and is a major contributor to global warming.^[1] The Kyoto Protocol and the Paris Agreement set ambitious goals and responsibilities for participating countries to curb GHGs emission.

Industrial processes, irrespective of their quality and quantity of production, must consider caring for the environment and the treatment of their hazardous wastes as part of an integral process. A previous study made by López et al.^[2] indicated that the anaerobic digestion process is an alternative to the treatment of organic waste that produces methane (55–70%) that can be used as a source of energy and carbon dioxide (30–45%)^[3], which should be treated to avoid its emission into the atmosphere.

Technologies for CO₂ removal and capture include physicochemical absorbents, direct injection into deep oceans or geological strata, and biological fixation (or mitigation). Those methods present significant challenges, including space requirements and prevention of possible CO₂ leakage.

Recently, biological mitigation technologies are becoming considered as economically viable and environmentally sustainable.^[4] The most promising alternative for reducing the concentration of CO₂ is fixation by photosynthetic

microorganisms, such as microalgae that are naturally developed in aquatic environments and use CO₂ as a source of carbon for the synthesis of organic components.^[5]

Microalgae capture and store carbon from CO₂ for their growth and they have a short duplication time of approximately 24–48 h. Mainly due to the high content of macronutrients and the fact that these microalgae can grow under different conditions, it is possible to obtain biomass with high value as a raw material.^[6]

Closed systems such as airlift photobioreactors (PBRs) play important roles in the mass cultivation of microalgae; it is a highly attractive approach compared with the open-air systems. These systems have many advantages including: relatively stable culture conditions, operation at higher concentrations, prevention or reduction of water evaporation, and low capital investment.^[7] The latter factor is an important element in the cost of producing products derived from microalgae.

Therefore, technologies based on microalgae cultivation in PBRs currently remains an active area under investigation as one of the most promising bioremediation alternatives for many sources of CO₂ emissions.^[8] The more relevant research related to the scope of this work is discussed below.

Da Silva et al.^[9] developed nanofibers with potential for the biological fixation of CO₂. When the nanofibers were used together with the microalgae *Chlorella fusca*, higher CO₂ biofixation (216.2 mg L⁻¹ day⁻¹) was obtained.

Neves et al.^[10] evaluated productivity, CO₂ biofixation and lipid content in biomass from the acidophilic microalga

CONTACT Juan Manuel Méndez-Contreras  jmendez@hotmail.com  División de Estudios de Posgrado e Investigación, Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Orizaba, Av. Oriente 9 No. 852, Col. E. Zapata, C.P. 94320, Orizaba, Veracruz, Mexico
 Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/lesa.

© 2018 Taylor & Francis Group, LLC

Chlamydomonas acidophila cultivated with five different carbon dioxide concentrations. The microalga presented better productivity when cultivated with 5 and 10% CO₂ injected into the PBR.

The study by Duarte et al.^[11] demonstrated *Chlorella fusca* and *Spirulina sp.* have the potential to fix CO₂ from coal flue gas and sequential biomass production with different biotechnological destinations. The maximum daily CO₂ from coal flue gas biofixation was obtained with *Chlorella fusca* (360.12 mg L⁻¹ day⁻¹). Certain species can be cultivated under 10-15% CO₂, a concentration that is usually present in coal power plant flue gases. However, high levels of flue gas components such as SO_x, NO_x and particulate material may cause inhibition of cell growth in some species.^[12]

In this context, the objective of this study was to mitigate the GHGs (CO₂) generated from the anaerobic digestion of physicochemical sludges, by using an airlift PBR at pilot-scale plant operated with *Chlorella spp.*, and thus determine the consumption and CO₂ removal, in addition to the composition of macromolecules (carbohydrates, lipids and proteins) in biomass from the microalga.

Materials and methods

Microalgae and culture conditions

Chlorella spp. is a gender reported in literature as having potential for CO₂ biofixation.^[13] It was obtained from the Culture Collection of the Instituto Politécnico Nacional (Mexico). Stock cultures were maintained in 1 L Erlenmeyer flasks containing 700 mL of culture. The inoculum was grown aseptically in a room at 22 ± 4 °C under constant lighting conditions in photoperiods of 12 h light/12 h dark, and it was continuously bubbled with air. The culture media used was Bold's basal with the following composition: 10 stock solutions per liter of a solution according to the method described in NMX-AA-087-SCFI-2010.^[14]

Experimental analyses of light intensity and CO₂ supply

To determine the appropriate values for greater biomass production from the microalga *Chlorella spp.* and to analyze the effect of different CO₂ concentrations and light intensity on the growth of microalga and on their physicochemical properties, the cultivation was carried out for 30 days in PBRs at a laboratory scale in 2.5 L Erlenmeyer flasks with useful volumes of 2 L and initial biomass concentrations of 0.1 g L⁻¹ and with photoperiods of 12 h light/12 h dark. The illumination was provided by 40 W fluorescent lamps. The aeration was performed with an air pump, Elite 801, and the CO₂ was injected every day for 1 min during the light phase of growth. A 3² factorial design of experiments (DoE) was applied (two replicates) in order to analyze the effect of both factors considered and to specify the recommended levels for the operating conditions (see Table 1). The PBRs 1, 2 and 3 were performed at 2000 lux and 2, 7 and 12% v v⁻¹ of CO₂, the PBRs 4, 5 and 6 were performed at 3000 lux

Table 1. Factors and levels of factorial design.

Factor	Low level	Medium level	High level
Lighting	2000 lux	3000 lux	4000 lux
CO ₂ concentration	2% (v v ⁻¹)	7% (v v ⁻¹)	12% (v v ⁻¹)



Figure 1. Pilot-scale plant photobioreactor.

and 2%, 7% and 12% v v⁻¹ of CO₂, and the PBRs 7, 8 and 9 were performed at 4000 lux and 2%, 7% and 12% v v⁻¹ of CO₂, respectively.

CO₂ supply during the growth of *Chlorella spp.* at pilot-scale plant

To evaluate the consumption of CO₂ by *Chlorella spp.*, the best operating conditions from the previous stage were used in order to validate the results obtained at laboratory level. The process was scaled up in a pilot-scale PBR type airlift (26 L), constructed from acrylic polyvinylchloride and illuminated with fluorescent lamps (40 W) at 4000 lux located on the external side (Fig. 1) in photoperiods of 12 h light/12 h dark as recommended by Liao et al.^[15] The feeding and discharge of the reactor were carried out with a Loctite 989401 peristaltic pump at 127 rpm.

The cultivation of *Chlorella spp.* was inoculated with 3% of the microalga and was operated in an airlift PBR at 22 ± 4 °C for 60 days, which consisted of adding 2% v v⁻¹ of CO₂ per day from the electric biogas generator as a complement to the anaerobic digestion of the physicochemical sludge process.

Three milliliters of the inlet and output gases of the PBR were measured by chromatographic analysis (BUCK

Scientific 310) to determine the consumption of CO₂ and the production of O₂; the results were presented as percentages by the reader software Peaksimple.

The liquid samples were collected to determine the concentration of biomass, which was monitored daily by measuring the optical density at 750 nm in a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Genesys 20 visible) with a calibration curve that correlates the optical density with the biomass dry weight for microalga.^[16] The pH of the cultivation was determined every 24 h with a digital pH meter (Orion 250-A).

At the end of the cultivation period, the corresponding characterization of the macromolecules (carbohydrates, lipids and proteins) in the biomass was evaluated.

Analytical methods

This section describes the methods used for the characterization of the biomass obtained in the PBR at pilot-scale plant with CO₂ supply.

The determination of carbohydrate content was measured by the method of phenol-sulfuric^[17] which is based on the formation of a colored compound by the reaction of phenol with the glycosides (sugars and their methyl derivatives, oligosaccharides and soluble polysaccharides), in the presence of concentrated H₂SO₄. The colored compound has a maximum absorbance at 490 nm which was measured with a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Genesys 20 visible).

The determination of lipids in a sample of dry biomass was made by the Soxhlet method of solid-liquid extraction using hexane as the solvent.^[18]

The protein concentration was determined by the Lowry method^[19] using a standard solution of bovine seroalbumina and Lowry reagent. The absorbance of the microalga *Chlorella* spp. was determined in a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Genesys 20 visible) at a wavelength of 750 nm.

The biomass concentration at the end of the cultivation was quantified by dry weight.^[20] The concentration of the biomass P_{max} (g L⁻¹) with the variation in cell concentration in a time interval is shown in the Equation (1):

$$P_{max} = (X_1 - X_0) / (t_1 - t_0) \quad (1)$$

Where:

X₁ = Biomass concentration (g L⁻¹) while the crop is t₁

X₀ = Biomass concentration (g L⁻¹) to initial time t₀

The determination of the rate of fixation of CO₂ P_{CO₂} (g L⁻¹ day⁻¹), the carbon content of the cells, and the maximum productivity of the biomass were assessed as shown in Equation (2):

$$P_{CO_2} = Cc P_{max} (M_{CO_2} / M_C) \quad (2)$$

Where:

Cc = Amount of carbon in *Chlorella* spp cells.

M_{CO₂} = Molecular weight of CO₂

M_C = Molecular weight of carbon

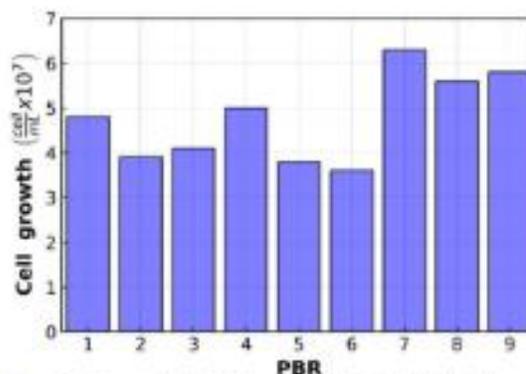


Figure 2. Cell growth of *Chlorella* spp. at different light intensity and CO₂ conditions.

P_{max} = Biomass productivity

Statistical analysis

The values presented in the tests are the average of two replicas and were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test for comparison of the means at a 95.0% confidence level.

Results and discussions

Recommended levels of light intensity and CO₂ supply

Figure 2 shows the average results for the 3² factorial DoE (explained in section "Experimental analyses of light intensity and CO₂ supply"). The PBRs 1, 2 and 3 under conditions of 2000 lux and 2, 7 and 12% CO₂, respectively, have growth similar to the PBRs 4, 5 and 6 under conditions of 3000 lux and 2, 7 and 12% CO₂. The PBRs 7, 8 and 9 with a light intensity of 4000 lux and 2, 7 and 12% CO₂, respectively, reached the best cell growth (6.3 × 10⁷, 5.6 × 10⁷ and 5.8 × 10⁷ cell mL⁻¹). So, the PBR 7 (4000 lux and 2% CO₂) presents the highest growth at the end of the process (30 days).

An analysis of variance applied to the factorial DoE indicates that the light intensity factor had a significant effect on the growth of the microalga *Chlorella* spp., while the CO₂ supply is not significant.^[21] Comparing the Fisher exact test, the *F*-statistic value from the table for CO₂ was 6.94 and the calculated *F* critical value was 5.25. It is noted there is a minimal difference between both values; the *F*-statistic to light intensity was 6.94 and the calculated *F* was 12.77, highlighting greater difference over light intensity. So, there is a higher significance level that the light intensity will benefit or affect growth. The behavior in our study is comparable with the results found by Gong et al.^[22] who indicate the effect of light intensities on the growth of *Chlorella vulgaris* in a light incubator showed that in terms of light intensity, the cell density under 3960 lux is highest. In this study, the highest cell density was under 4000 lux. Ota et al.^[23]

reported similar results with microalga *Chlorococcum littorale* and demonstrated that light intensity affected cell growth and it was treated in a mathematical model.

An increase in biomass productivities and in CO₂ uptake rates with increasing light irradiance has already been described. In fact, photosynthetic rate is directly proportionally to light irradiance, resulting in an increase in biomass productivities and in CO₂ uptake.^[24] This can be observed in Figure 2, where the results show that higher growth (6.3 × 10⁷ cell mL⁻¹) was obtained in PBR 7 under 4000 lux than the growth observed under 2000 and 3000 lux (3.9 × 10⁷ and 3.6 × 10⁷ cell mL⁻¹) which was obtained in PBRs 2 and 6, respectively.

According to Li et al.^[25] microalgal productivity of 2% CO₂ was higher than that of 8% CO₂ using microalga *Chlorella vulgaris*. They concluded that the low microalgal productivity of 8% CO₂ was because excessive dissolved CO₂ inhibited microalgal growth. In this study, the highest cell density was under 2% CO₂. The higher cell density observed in PBRs 7, 8 and 9 can be obtained by maintaining adequate light intensity. In addition, considering that there was a higher growth in PBR 7 and based on the discussion above, the PBR should be operated at 4000 lux with CO₂ supply at 2% v v⁻¹ in order to obtain the highest concentration of cell growth, which leads to a greater capacity for removal of CO₂.

pH

The pH values were measured during the process of supplying CO₂ and lighting. Khalil et al.^[26] showed that *Chlorella* can grow in a wide pH range (4–10) and the maximum biomass yield was obtained in alkaline conditions (pH at 9 and 10). As shown in Figures 3 and 4, with light intensity under 2000 and 3000 lux, the pH range obtained in the PBRs 1–3 and 4–6, respectively, fluctuated from 7.0 to 9.5, while the pH under 4000 lux (Fig. 5) fluctuated from 8.0 to 10.0 (alkaline conditions) and these conditions reached the highest growth. The cell density increased with the increase of pH and it was highest with pH controlled at 10.0.^[19] This may be the main reason for the higher cell density reached in PBR 7.

The supply of CO₂ to microalgae cultivation is a determining process in the efficient development of microorganisms because it contributes to the photosynthetic process and controls the pH of the culture.

The pH rises due to CO₂ consumption. When CO₂ dissolves in water, three inorganic carbon species are present in the aqueous phase: CO_{2(aq)}, bicarbonate, and carbonate ions. The pH of the culture also increases and can retain inorganic carbon content in the aqueous phase.^[27] As shown in the present study, the minimum pH was 8.25 and the maximum was 9.89. This proves the capacity of the microalga *Chlorella* spp. to tolerate a wide range of pH with satisfactory growth, which is beneficial for the study and treatment of CO₂ with this microalga.^[28]

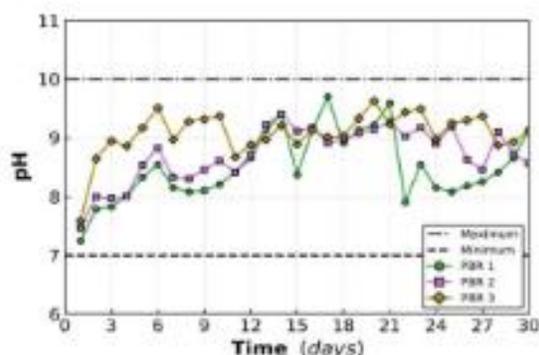


Figure 3. pH behavior at 2000 lux and 2, 7 and 12% CO₂.

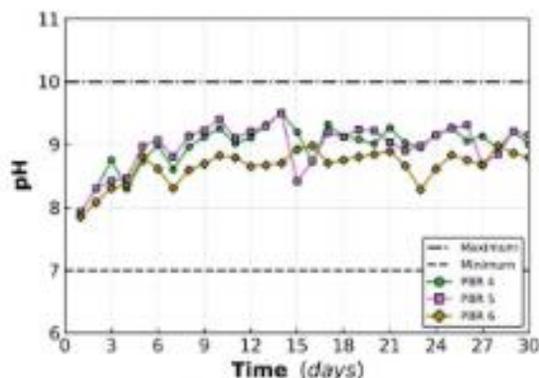


Figure 4. pH behavior at 3000 lux and 2, 7 and 12% CO₂.

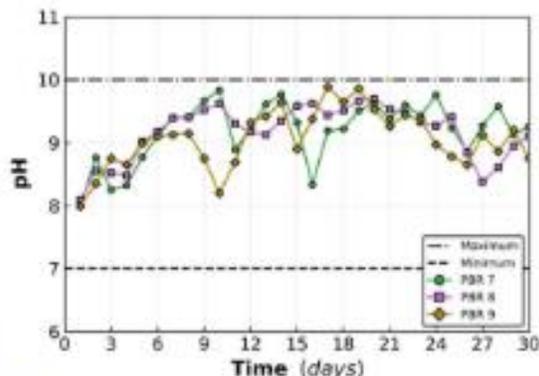


Figure 5. pH behavior at 4000 lux and 2, 7 and 12% CO₂.

Effect of CO₂ supply on *Chlorella* spp. at the pilot-scale plant

Figure 6 shows the growth curve of *Chlorella* spp. in the airlift PBR during the 60 days it was operated at 4000 lux and with a 2% CO₂ supply. It shows that the stage from 0 to 10 days is a phase of adaptation of the microalgae and subsequently it reached a maximum growth of 2.1 × 10⁷ cell mL⁻¹ on day 31. Robles et al.^[29] reported that the growth

of *Chlorella Vulgaris* in an airlift PBR was 1.18×10^7 cell mL^{-1} in a period of 4–6 days. The delay in reaching the maximum growth in the present study is attributed to an early supply of CO_2 during the lag phase of the microalga while the cell density was still low (2.56×10^4 cell mL^{-1}) and the *Chlorella* cells were not able to perform the photosynthetic process. Moreover, the solubility of the CO_2 supplied from biogas also induced low pH, down to 5.81 (Fig. 7). This is comparable with Choix et al.^[30] who reported pH 5.60 in culture media of *Chlorella sp.* This happens when CO_2 dissolves in water because carbonate ions, bicarbonate ions, and CO_2 in aqueous form will coexist. When the pH value is over 6.3, the inorganic carbon will be stabilized in the form of the bicarbonate ion. Since CO_2 can freely diffuse in and out of aqueous solution, the higher CO_2 concentration dissolved in water will lower the pH value and this results in a decrease in the extracellular carbonic anhydrase activity and finally inhibits microalgae growth. Hence, a suitable supply of CO_2 concentration for cultivation of microalgae in the log phase can enrich its carbon content to increase the algal biomass.^[31]

The dynamic behavior of pH is shown in Figure 7 where CO_2 would appear as H_2CO_3 , HCO_3^- or CO_3^{2-} in water, depending on the pH value. A high concentration of CO_2 in water would result in a decline in pH due to carbonic acid formation.^[32] The initial pH value rapidly dropped in day 10, which was proportional to the concentration of CO_2 supply. As the assimilation of CO_2 by microalgae occurred, the pH value increased due to CO_2 depletion; when bicarbonate is the only source of carbon, the culture pH will rise.^[33] This effect can be observed on day 33 (Fig. 6) because the microalga culture was in the log phase and the pH increased until it reached a stable behavior.

Biomass production and CO_2 fixation rate by *Chlorella* spp. at pilot-scale plant

Photosynthetic activity and growth rates of microalgae are limited by the light cycles provided to the crops. Thus, Li et al.^[20] reported that variations in volumetric productivity and cell growth are based on the cycles of luminosity to which the crop is exposed. Carbon dioxide fixation rates are related to the energy that cells receive during light cycles.

Table 2 shows that the biomass production of *Chlorella* spp. in the PBR obtains a maximum concentration of 2.18 g L^{-1} . Similar studies have been previously published about related species. Tejeda et al.^[34] reported that *Chlorella Vulgaris* obtains biomass values of 0.27 g L^{-1} and Chia et al.^[35] obtained 0.84 g L^{-1} with *Chlorella vulgaris*. In these studies, *C. vulgaris* showed a lower biomass production compared with Agwa et al.^[36] who reported 2.47 g L^{-1} using *Chlorella* spp. This shows that the microalga *Chlorella* spp. used in this study has a capacity of biomass production congruent with or slightly higher than that reported by the authors mentioned above.

Figure 8 shows the percentages of CO_2 and O_2 in the PBR. There is an increase of *Chlorella* spp. in the exponential phase due to the CO_2 supply; CO_2 removal (measured with chromatographic analysis) shows a maximum value of 91.92% at day 23 and higher production of O_2 at day 31 with 47.66%.

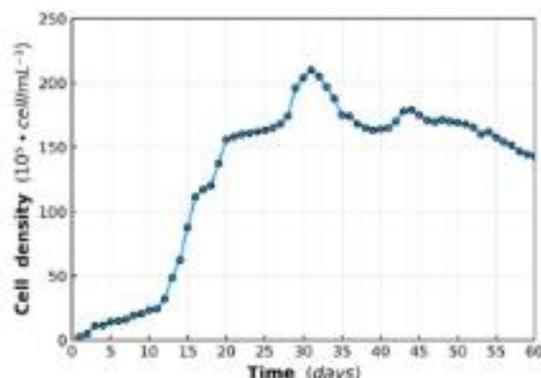


Figure 6. Cell growth curve of *Chlorella* spp. in PBR.

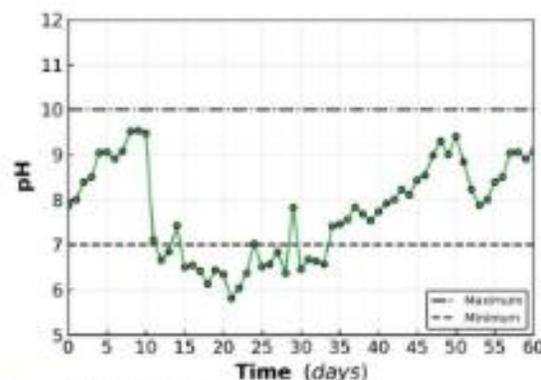


Figure 7. pH behavior in PBR.

Chaudhary et al.^[37] and Shabani et al.^[38] reported 76% and 84% CO_2 removal respectively by *Chlorella vulgaris*, lower than the values obtained in this investigation. This difference can be attributed to the different growth conditions of each microalgae or the species dependent efficiency of CO_2 removal. Also, fixation may be due to physiological conditions of microalgae, such as the potential for cell growth and ability to metabolize CO_2 . According to Rodas et al.^[39] biomass productivity is affected by several factors such as nutrient concentration, light intensity, CO_2 supply and culture media. These factors influence the growth and composition of the biomass produced.

The CO_2 fixation rate of the microalga *Chlorella* spp. was evaluated in the PBR and the best result obtained was $0.63 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ on day 32 (Shabani et al.^[38] reported $0.67 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ by *Chlorella* spp). On the other hand, García^[40] obtained a CO_2 fixation rate of $0.6 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ by the microalga *Chlorella* spp. and these results are very similar to those obtained in this research.

Biomass characterization of *Chlorella* spp.

Table 3 shows the biomass characterization of *Chlorella* spp. without CO_2 supply and under the recommended levels (4000 lux and 2% CO_2).

Table 2. Biomass production, maximum productivity and CO₂ fixation by *Chlorella* spp. in PBR (4000 lux, 2% CO₂).

Microalga	Biomass production (g L ⁻¹)	Maximum productivity (g L ⁻¹ day ⁻¹)	CO ₂ fixation (g L ⁻¹ day ⁻¹)
<i>Chlorella</i> spp	2.18	0.94	0.63

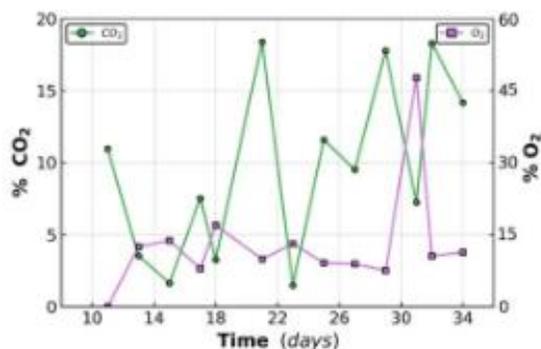


Figure 8. Percentage of CO₂ removal and O₂ production.

In this study, the production of carbohydrates decreased with the addition of CO₂. Before CO₂ was supplied, the content was 173.4 ± 2.3 μg mL⁻¹ and it was 135 ± 2.8 μg mL⁻¹ after CO₂ supply. The same behavior was reported by Moreira et al.^[41] who found that in different cultures of microalgae, the concentration of carbohydrates was lower due to the addition of CO₂.

The highest protein concentration (200 ± 2.6 mg L⁻¹) was obtained with 2% CO₂ compared to the value of 138 ± 1.4 mg L⁻¹ without CO₂ supply. Similar results were found by Barajas et al.^[42] who reported that *Chlorella Vulgaris* had a total production of proteins from 150 to 280 mg L⁻¹. The analysis of the chemical composition of *Chlorella* spp. revealed an inverse relationship between the content of protein and carbohydrates. Higher levels of protein and lower levels of carbohydrates were obtained for the microalgae cultivated with 2% (v/v⁻¹) CO₂. Wong et al.^[52] reported the use of CO₂ increased the protein content and decreased the carbohydrate content.

The lipid content decreased when the *Chlorella* spp. was aerated with 2% CO₂ and 14.56 ± 1.8% was obtained. This is in contrast with the value of 16.1 ± 2% obtained without CO₂ supply. However, lipid content in the cells cultured at 2% CO₂ and without CO₂ were very similar. According to Cheng et al.^[43], the lipid content of *Chlorella fusca* and *Phaeodactylum tricornutum* increased when cells were grown at higher concentrations of CO₂. Our result was not consistent with these previous studies. Such divergent results for lipid content of microalgae cultured under CO₂ supply may be due to differences in microalgal species, content of culture medium, and culture conditions.

Conclusion

As part of a comprehensive process to combat GHGs, the mitigation of CO₂ that is usually generated in the combustion processes for obtaining bioenergy by anaerobic digestion was analyzed. The mitigation process of CO₂ can be

Table 3. Biomass characterization of *Chlorella* spp.

<i>Chlorella</i> spp.	Proteins (mg L ⁻¹)	Lipids (%)	Carbohydrates (μg mL ⁻¹)
Without CO ₂ supply	138 ± 1.4	16.1 ± 2	173.2 ± 2.3
(4000 lux, 2% CO ₂)	200 ± 2.6	14.56 ± 1.8	135 ± 2.8

implemented in the anaerobic digestion process of sludge or other organic wastes as well as in a wide variety of processes that must be studied to avoid the emission of carbon dioxide to atmosphere.

The study shows that *Chlorella* spp. cultivated in an airlift PBR has the maximum growth and CO₂ mitigation at 4000 lux and 2% CO₂. Furthermore, the maximum cell concentration, CO₂ fixation rate, and CO₂ removal efficiency were 2.1 × 10⁷ cell mL⁻¹, 0.63 g L⁻¹ day⁻¹ and 91.92%, respectively. Therefore, *Chlorella* spp. is a good choice for CO₂ mitigation of flue gases. Due to the high content of macronutrients (carbohydrates, lipids, proteins) found in the biomass, it represents a valuable raw material for various nutritional and pharmaceutical industries.

The results of this study represent viable alternatives for reducing the negative environmental effects caused by the emission of this gas into the atmosphere. Finally, efforts should be directed towards microalgal production on a large scale, as well as towards evaluating other genera of microalga due to the high diversity and biotechnological potential of each microalgal strain.

Funding

The authors acknowledge the financial support to Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT) through the announcement 206803 CONACyT-BMBF2013 and the Ph.D. scholarship. Also, thanks to the Tecnológico Nacional de México (TecNM) through the announcement 5388.14-P. National Technological of Mexico (TNM).

Caballero-García Margarita [ORCID LOGO] <https://orcid.org/0000-0002-3164-9887>

ORCID

Alejandro Alvarado-Lassman  <http://orcid.org/0000-0001-9818-4300>

References

- [1] Zhou, W.; Wang, J.; Chen, P.; Ji, C.; Kang, Q.; Lu, B.; Li, K.; Liu, J.; Ruan, R. Bio-Mitigation of Carbon Dioxide Using Microalgal Systems: Advances and Perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2017, 76, 1163–1175. DOI: 10.1016/j.rser.2017.03.065.
- [2] López, L. A.; Martínez, S.; Corte, G.; Méndez, J. M. Influence of Organic Loading Rate on Methane Production in a CSTR from

- Physicochemical Sludge Generated in a Poultry Slaughterhouse. *J. Environ. Sci. Health A* **2014**, *49*, 1710–1717.
- [3] Yuan-Chen, X.; Vinh-Thang, H.; Avalos-Ramirez, A.; Rodrigue, D.; Kallaguine, S. Membrane Gas Separation Technologies for Biogas Upgrading. *Rev. Adv.* **2015**, *5*, 24399–24448. DOI: 10.1039/C5RA00666f.
- [4] Shobnam, S.; R. G. Development of Photobioreactors for Improvement of Algal Biomass Production. *Int. J. Sci. Res.* **2015**, *50*, 324–329.
- [5] Siddiqui, S.; Ramchayah, G. N.; Kavya, G. Development of Photobioreactors for Improvement of Algal Biomass Production. *Int. J. Sci. Res.* **2015**, *4*, 220–225.
- [6] Ward, A. J.; Lewis, D. M.; Green, F. B. Anaerobic Digestion of Algae Biomass: A Review. *Algal Res.* **2014**, *5*, 204–214. DOI: 10.1016/j.algal.2014.02.001.
- [7] Huang, Q.; Jiang, F.; Wang, L.; Yang, C. Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering* **2017**, *3*, 318–329. DOI: 10.1016/j.eng.2017.03.020.
- [8] Raeesossadati, M. J.; Ahmadzadeh, H.; McHenry, M. P.; Moheimani, N. R. CO₂ Bioremediation by Microalgae in Photobioreactors: Impacts of Biomass and CO₂ Concentrations, Light, and Temperature. *Algal Resour.* **2014**, *6*, 78–85. DOI: 10.1016/j.algal.2014.09.007.
- [9] Da Silva Vaz, B.; Costa, J. A. V.; Greque de Moraes, M. Innovative Nanofiber Technology to Improve Carbon Dioxide Biofixation in Microalgae Cultivation. *Bioresour. Technol.* **2018**.
- [10] Da Neves, F.; de, F.; Hoinaski, L.; Röing, L. R.; Derner, R. B.; de Melo Lisboa, H. Carbon Biofixation and Lipid Composition of an Acidophilic Microalgae Cultivated on Treated Wastewater Supplied with Different CO₂ Levels. *Environ. Technol.* **2018**. DOI: 10.1080/09593330.2018.1471103.
- [11] Duarte, J. H.; de Moraes, E. G.; Radmann, E. M.; Costa, J. A. V. Biological CO₂ Mitigation from Coal Power Plant by *Chlorella fuxa* and *Spirulina* sp. *Bioresour. Technol.* **2017**, *234*, 472–479.
- [12] Kumar, K.; Banerjee, D.; Das, D. Carbon Dioxide Sequestration from Industrial Flue Gas by *Chlorella sorokiniana*. *Bioresour. Technol.* **2014**, *152*, 225–233. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.10.098.
- [13] Kasiri, S.; Ulrich, A.; Prasad, V. Optimization of CO₂ Fixation by *Chlorella Kestleri* Cultivated in a Closed Raceway Photo-Bioreactor. *Bioresour. Technol.* **2015**, *194*, 144–155.
- [14] NMX-AA-087-SCFI-2010. *Water analysis-Test Method*. **2010**, 34–35.
- [15] Liao, Q.; Li, L.; Chen, R.; Zhu, X. A Novel Photobioreactor Generating the Light/dark Cycle to Improve Microalgae Cultivation. *Bioresour. Technol.* **2014**, *161*, 186–191. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.02.119.
- [16] Chioccioli, M.; Hankamer, B.; Ross, I. L. Flow Cytometry Pulse Width Data Enables Rapid and Sensitive Estimation of Biomass Dry Weight in the Microalgae *Chlorella minutissima reinhardtii* and *Chlorella Vulgaris*. *PLoS One* **2014**, *9*, e97269. DOI: 10.1371/journal.pone.0097269.
- [17] Nielsen, S. S. Total Carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid Method. In: *Food Analysis Laboratory Manual. Food Science Text Series*. Springer, Cham. **2017**.
- [18] Horwitz, W. Association of Official Analytical Chemists. In *Official Methods of Analysis of the AOAC*. No. Ed. 15, **2010**: Vol. 2.
- [19] Walker, J. M. The Lowry Method for protein quantitation. In *The Protein Protocols Handbook*. Springer, **2002**.
- [20] Li, E.; Mira de Orduna, R. A Rapid Method for the Determination of Microbial Biomass by Dry Weight Using a Moisture Analyzer with an Infrared Heating Source and an Analytical Balance. *Let. Appl. Microbiol.* **2010**, *50*, 283–288. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02789.x.
- [21] Montgomery, D. C. *Diseño y Análisis de Experimentos*. 2nd ed.; Grupo Editorial Limusa Wiley S.A. de C.V.: Mexico, **2014**: 45–222.
- [22] Gong, Q.; Feng, Y.; Kang, L.; Luo, M.; Yang, J. Effects of Light and pH on Cell Density of *Chlorella Vulgaris*. *Energy Procedia* **2014**, *61*, 2012–2015. DOI: 10.1016/j.egypro.2014.12.064.
- [23] Ota, M.; Takenaka, M.; Sato, Y.; Smith, R.; Inomata, H. Effects of Light Intensity and Temperature on Photoautotrophic Growth of a Green Microalga, *Chlorella minutissima*. *Biochem. Biotechnol. Reports* **2015**, *7*, 24–29. DOI: 10.1016/j.btre.2015.05.001.
- [24] Gonçalves, A. L.; Simões, M.; Pires, J. C. M. The Effect of Light Supply on Microalgal Growth, CO₂ Uptake and Nutrient Removal from Wastewater. *Energy Convers. Manag.* **2014**, *85*, 530–536. DOI: 10.1016/j.enconman.2014.05.085.
- [25] Pires, J. C. M.; Gonçalves, A. L.; Martins, F. G.; Alvim-Ferraz, M. C. M.; Simões, M. Effect of Light Supply on CO₂ Capture from Atmosphere by *Chlorella Vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang* **2013**, 1–9.
- [26] Khalil, Z.; Asker, M. M.; El-Sayed, S.; Kobbia, I. A. Effect of pH on Growth and Biochemical Responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoides*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 1225–1231. DOI: 10.1007/s11274-009-0292-z.
- [27] Zhang, Q.; Zhan, J. J.; Hong, Y. The Effects of Temperature on the Growth, lipid Accumulation and Nutrient Removal Characteristics of *Chlorella* sp. HQ. *Desalination Water Treatment* **2015**, 1–6.
- [28] Zúñiga, A. B. Reduction of carbon footprint by Means of *Chlorella* sp. cultures in Photobioreactors. *J. Technol. Fertilization* **2013**, *2*, 2013.
- [29] Robles, J. C.; Sacramento, J. C.; Ruiz, A.; Bar, S.; Canedo, Y.; Narváez, A. Evaluation of Cell Growth, nitrogen Removal and Lipid Production by *Chlorella vulgaris* to Different Conditions of Aeration in Two Types of Annular Photobioreactors. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **2016**, *15*, 361–377.
- [30] Choix, F. J.; Ochoa, M. A.; Hsieh, M.; Mondragon, P.; Mender, H. O. High Biomass Production and CO₂ Fixation from Biogas by *Chlorella* and *Scenedesmus* Microalgae Using Tequila Vinasses as Culture Medium. *J. Appl. Phycol.* **2018**.
- [31] Xia, J. R.; Gao, K. S. Impacts of Elevated CO₂ Concentration on Biochemical Composition, carbonic Anhydrase, and Nitrate Reductase Activity of Freshwater Green Microalgae. *J. Integr. Plant Biol.* **2005**, *47*, 668–675.
- [32] Wong, Y. K.; Ho, C.; Lai, P. K.; Leung, C.; Ho, Y. M.; Lee, O. K.; Leung, H. M. A Study on Algal Growth Behaviour under Different Sparging Period of CO₂ Supplementation. *Conference Paper: 1st International Conference on Beneficial Uses of Algal Biomass (ICBUAB), Hong Kong*. **2013**.
- [33] Rost, B.; Riebesell, U.; Burkhardt, S.; Sultemeyer, D. Carbon Acquisition of Bloom-forming Marine Phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **2003**, *48*, 55–67. DOI: 10.4319/lo.2003.48.1.0055.
- [34] Tejeda, L.; Argumedo, D. H.; Abrear, M.; Saldarriga, C. R. Characterization and Lipid Profile of Oil from Microalgae. *Facultad de Ingeniería* **2015**, *24*, 43–54.
- [35] Chia, M. A.; Lombardi, A. T.; Melo, M. Growth and Biochemical Composition of *Chlorella vulgaris* in Different Growth Media. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2013**, *4*, 1427–1438. DOI: 10.1590/0001-3765201393312.
- [36] Agwa, O. K.; Ibe, S. N.; Abu, G. O. Biomass and Lipid Production of a Fresh Water Algae *Chlorella* sp. using Locally Formulated Media. *Int. Res. J. Microbiol.* **2014**, *3*, 288–293.
- [37] Chaudhary, R.; Tong, Y. W.; Dikshit, A. K. Kinetic Study of Nutrients Removal from Municipal Wastewater by *Chlorella vulgaris* in Photobioreactor Supplied with CO₂-enriched Air. *Environ. Technol.* **2018**. DOI: 10.1080/09593330.2018.1508250.
- [38] Shahani, M.; Sayadi, M. H.; Benzeai, M. R. CO₂ Bio-sequestration by *Chlorella Vulgaris* and *Spirulina platensis* in Response to Different Levels of Salinity and CO₂. *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.* **2016**, *6*, 53–61.
- [39] Rodas, H. A.; Rodríguez, H.; Luna, A. I.; Alcalá, J.; Vidales, J. A.; Biomasa, F.J. Production and Quality Estimation of *Chlorella vulgaris* (CLV2) under Large Scale Production Conditions. *J. Exp. Bot. Agric. Sci.* **2016**, *4*, 493–498.

8  M. CABALLERO-GARCÍA ET AL.

- [40] García-Cubero, R. Biomass production of microalgae rich in carbohydrates completed to the photosynthetic elimination of CO₂. Ph.D. Thesis. Universidad de Sevilla. España, 2014.
- [41] Moreira, J. B.; Terra, A. L. M.; Costa, J. A. V.; Morais, M. G. Utilization of CO₂ in Semi-continuous Cultivation of *Spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and Evaluation of Biomass Composition. *Braz. J. Chem. Eng.* 2016, 33, 691-698. DOI: 10.1590/0104-4632.20160333x20150135.
- [42] Barajas, S. A. F.; Godoy, R. C. A.; Monroy, D. J. D.; Barajas, F. C.; Kazarov, V. Improvement of CO₂ Sequestration by *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 on Lab Scale Photobioreactors. *Rev. Iun* 2012, 25, 39-47.
- [43] Cheng, D.; Li, D.; Yuan, Y.; Zhou, L.; Li, X.; Wu, T.; Wang, L.; Zhao, Q.; Wei, W.; Sun, Y. Improving Carbohydrate and Starch Accumulation in *Chlorella* sp. AE10 by a Novel Two-stage Process with Cell Dilution. *Biotechnol. Biofuels* 2017, 10, 75 2-14.

2) Dentro de los productos finales del presente proyecto se encuentra en proceso el trámite de patente del proceso y diseño del fotobiorreactor utilizado durante la investigación.

3)



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CELAYA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

AMIDIQ

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

Nuevas tecnologías y tendencias en la Ingeniería Química

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS, MARIA BETSABE HERRERA YAÑEZ,
MARGARITA CABALLERO GARCÍA, GUILLERMO CORTÉS ROBLES Y ALEJANDRO
ALVARADO LASSMAN

Por la presentación del trabajo:

**"DETERMINACIÓN DE LA DOSIS RECOMENDABLE DE MEDIO DE CULTIVO PARA
EL ÓPTIMO CRECIMIENTO DE CHLORELLA SPP."**

Título: Quimiocontrol
Diseño: Aurelio Agustín Rojas Rubio, Pinar
Ejecución: Raúl Solís Medina, Escobar
Colaboradores: Macdonato López, Sergio Adriana Rodríguez Andrade, Cecilia Rangel Mexicana, Dolores María Elizabeth Contreras Ontaño, Alejandro Lemus Ortiz.
Fecha: 24 de Agosto de 2015.
Moral otorgado en la Unidad de Convivencia Estudiantil del Campus II del Instituto Tecnológico de Celaya

XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ
Puerto Vallarta, Jalisco, México, del 3 al 6 de mayo de 2016


Dr. Mauricio Sales Cruz
PRESIDENTE DE AMIDIQ


Dr. Pedro Alberto Quintana Hernandez
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR


Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

4)



Otorgan el presente
RECONOCIMIENTO

A: Juan Manuel Méndez Contreras, Margarita Caballero García, María Betsabe Herrera
Yañez, Alejandro Alvarado Lassman, Jesús Atenodoro Alonso.

Por haber presentado la ponencia: **CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y
REOLÓGICA DURANTE EL CRECIMIENTO DE *Chlorella spp* EN MEDIO BASAL
BOLD**

**XV Congreso
Internacional**
Academia Nacional de Ciencias Ambientales

**XXI Congreso
Nacional de Ciencias
Ambientales**
"La cultura de los pueblos, base para la conservación del ambiente"

Realizado del 15 al 17 de junio del año en curso, con sede en el
Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca.


M. C. Oscar Antonio Silva Sánchez
Director
Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca


M. C. Juan Angel Valera Pérez
Presidente
Academia Nacional de Ciencias Ambientales
Oaxaca, Oax., México, Junio 2016.


Dra. Gisela V. Campos Ángeles
Secretaría
Academia Nacional de Ciencias Ambientales



ANEXOS

ANEXO A: Elaboración de medio de cultivo Bold Basal (MBB)

La preparación del medio de cultivo de *Chlorella spp.* se basó en el apéndice normativo B de la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010

Preparar 100 mL de cada una de las Soluciones Stock, conforme a la siguiente tabla.

Disolución Stock	Reactivo (s)	Peso (g)
1	Nitrato de Sodio (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 (KH_2PO_4)	17.5
5	Fosfato dibasico de potasio (K_2HPO_4)	7.5
6	Cloruro de sodio (NaCl)	2.5
7	Sulfato ferroso hepta hidratdo ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) + 100 μL de H_2SO_4	0.498
8	Acido Borico (H_2BO_3)	1.142
9	EDTA	5.0
	Hidroxido de potasio (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 (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

Una vez preparadas las 10 soluciones Stock, se toma 1.5 mL de cada una y se afora a 1 L.

Nota: Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

ANEXO B: Elaboración de medio de cultivo Utex

Preparar las soluciones de metales traza A5 y metales traza B6 modificado de acuerdo a las siguientes tablas:

Metales traza A5

Reactivo	Peso
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.39 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079 g
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	49.4 mg
Agua Destilada	Aforar a 1 L

Metales traza B6

Reactivo	Peso
NH ₄ NO ₃	0.23 g
K ₂ Cr ₂ (SO ₄) ₄ · 24H ₂ O	96.0 mg
NiSO ₄ · 7H ₂ O	47.8 mg
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	17.9 mg
Ti ₂ (SO ₄) ₃	40.0 mg
Agua Destilada	Aforar a 1 L

Preparar la solución final de acuerdo a la siguiente tabla:

Reactivo	Peso
NaHCO ₃	16.8 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
NaNO ₃	2.5 g
K ₂ SO ₄	1.0 g
NaCl	1.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
EDTA	0.08 g
Solución de metales traza A5	1 mL
Solución de metales traza B6	1 mL
Agua destilada	Aforar a 1 L

Nota: Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

ANEXO C: Datos reológicos fase inicial de cultivo

Se obtuvieron los siguientes parámetros reológicos en la fase inicial del crecimiento de la microalga *Chlorella spp.*:

Puntos	Velocidad de corte $\dot{\gamma}$ (1/s)	Esfuerzo de corte experimental (Pa)	Viscosidad experimental (Pa/s)	Esfuerzo de corte Modelo H-B (Pa)	Viscosidad ajustada (Pa/s)
1	35.7	0.105	0.00295	0.111	0.00311
2	71.4	0.281	0.00393	0.263	0.00368
3	107	0.593	0.00526	0.5	0.00467
4	143	.895	0.00626	0.818	0.00572
5	179	1.29	0.00723	1.21	0.00679
6	214	1.73	0.00809	1.68	0.00786
7	250	2.2	0.0088	2.23	0.00891
8	286	2.82	0.00987	2.85	0.00996
9	321	3.44	0.0107	3.53	0.011
10	357	4.04	0.0113	4.29	0.012
11	393	4.73	0.012	5.12	0.013
12	429	5.5	0.0128	6.01	0.014
13	464	6.4	0.0138	9.97	0.015
14	500	7.32	0.0146	8	0.016
15	536	8.45	0.0158	9.09	0.017
16	571	9.67	0.0169	10.3	0.0179
17	607	10.9	0.0179	11.5	0.0189
18	643	12.4	0.0193	12.8	0.0199
19	679	13.9	0.0205	14.1	0.0208
20	714	15.6	0.0218	15.5	0.0217
21	750	17.1	0.0228	17	0.0227
22	786	20	0.0254	18.5	0.0236
23	821	21.8	0.0265	20.2	0.0245
24	857	23.7	0.0277	21.8	0.0255
25	893	25.9	0.029	23.5	0.0264
26	929	28	0.0301	25.3	0.0273
27	964	30.3	0.0314	27.2	0.0282
28	1000	32.4	0.0324	29.07	0.0293

ANEXO D: Datos reológicos fase exponencial de cultivo

Se obtuvieron los siguientes parámetros reológicos en la fase exponencial del crecimiento de la microalga *Chlorella spp.*:

Puntos	Velocidad de corte $\dot{\gamma}$ (1/s)	Esfuerzo de corte experimental (Pa)	Viscosidad experimental (Pa/s)	Esfuerzo de corte Modelo H-B (Pa)	Viscosidad ajustada (Pa/s)
1	35.7	0.103	0.0029	0.11	0.00307
2	71.4	0.279	0.0039	0.257	0.0036
3	107	0.554	0.00517	0.488	0.00456
4	143	0.878	0.00615	0.799	0.00559
5	179	1.3	0.0073	1.19	0.00664
6	214	1.68	0.00786	1.65	0.00769
7	250	2.14	0.00856	2.18	0.00873
8	286	2.71	0.00949	2.79	0.00976
9	321	3.37	0.0105	3.47	0.0108
10	357	3.93	0.011	4.21	0.0118
11	393	4.61	0.0117	5.03	0.0128
12	429	5.47	0.0128	5.91	0.0138
13	464	6.36	0.0137	6.86	0.0148
14	500	7.24	0.0145	8.87	0.0157
15	536	8.34	0.0156	8.95	0.0167
16	571	9.49	0.0166	10.1	0.0177
17	607	10.7	0.0176	11.3	0.0186
18	643	12.1	0.0188	12.6	0.0196
19	679	13.6	0.0201	13.9	0.0205
20	714	15.2	0.0212	15.3	0.0215
21	750	16.6	0.0222	16.8	0.0224
22	786	19.4	0.0247	18.3	0.0233
23	821	21.3	0.0259	19.9	0.0242
24	857	23.3	0.0272	21.6	0.0252
25	893	25.4	0.0285	23.3	0.0261
26	929	27.5	0.0296	25	0.027
27	964	29.8	0.0309	26.9	0.0279
28	1000	31.9	0.0319	28.8	0.0288

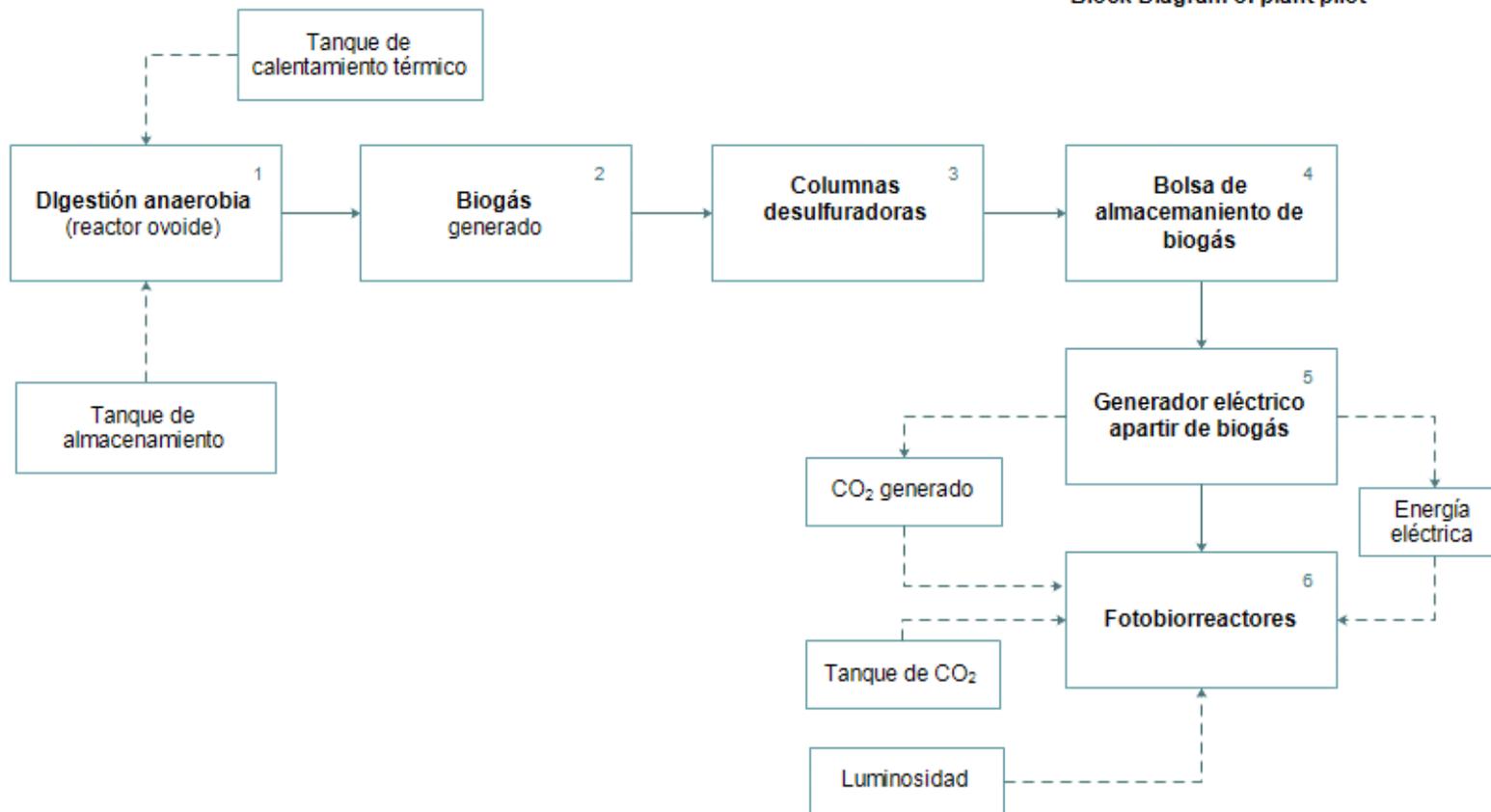
ANEXO E: Datos reológicos máximo crecimiento

Se obtuvieron los siguientes parámetros reológicos en la fase final del crecimiento de la microalga *Chlorella spp.*:

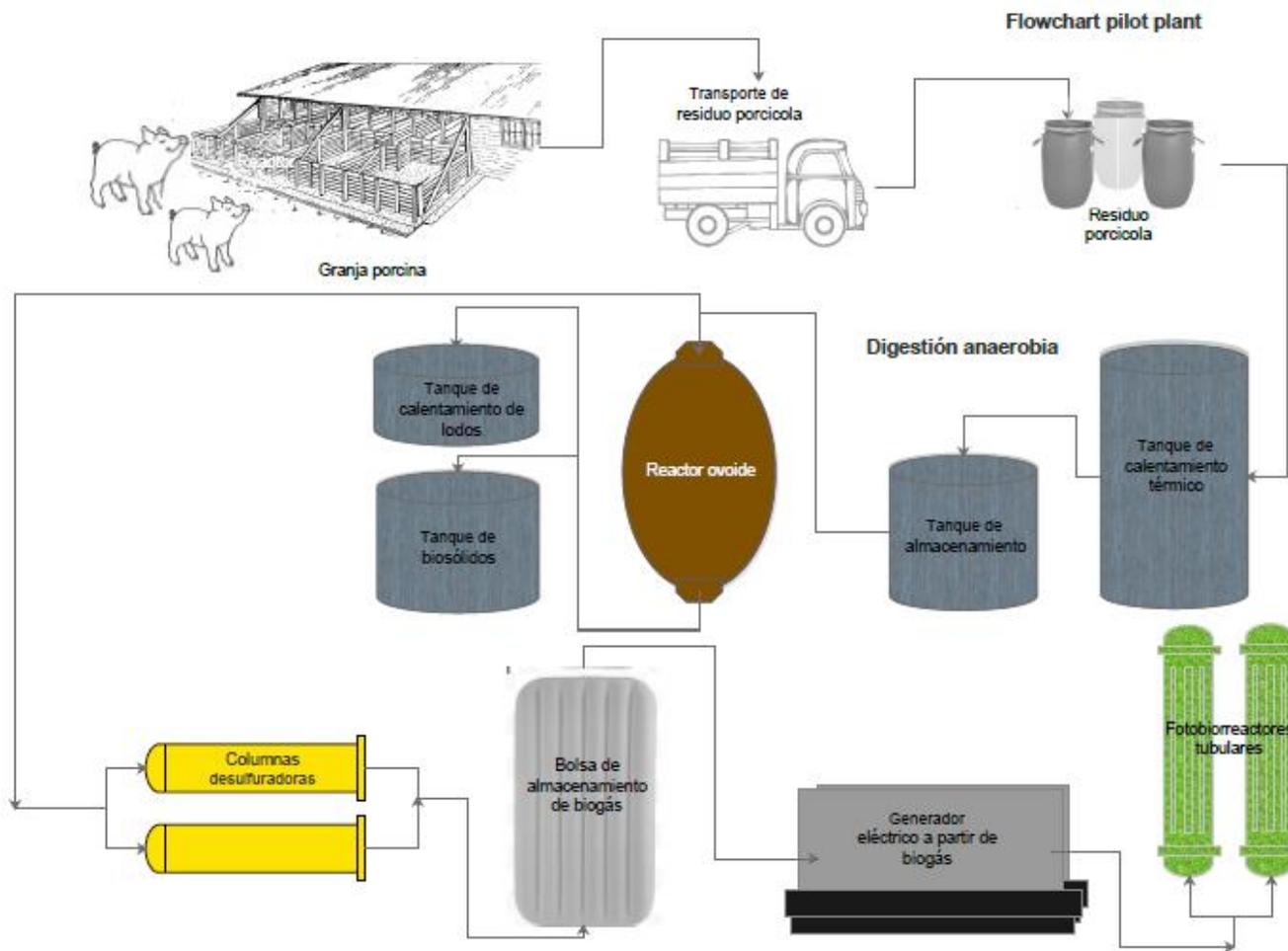
Puntos	Velocidad de corte $\dot{\gamma}$ (1/s)	Esfuerzo de corte experimental (Pa)	Viscosidad experimental (Pa/s)	Esfuerzo de corte Modelo H-B (Pa)	Viscosidad ajustada (Pa/s)
1	35.7	0.105	0.00293	0.11	0.00309
2	71.4	0.278	0.0039	0.258	0.00361
3	107	0.551	0.00514	0.49	0.00457
4	143	0.882	0.00618	0.801	0.00561
5	179	1.28	0.00717	1.19	0.00667
6	214	1.71	0.00796	1.65	0.00772
7	250	2.17	0.00868	2.19	0.00877
8	286	2.77	0.00971	2.8	0.00981
9	321	3.38	0.0105	3.48	0.0108
10	357	3.98	0.0111	4.24	0.0119
11	393	4.68	0.0119	5.06	0.0129
12	429	5.48	0.0128	5.95	0.0139
13	464	6.37	0.0137	6.9	0.0149
14	500	7.27	0.0145	7.93	0.0159
15	536	8.35	0.0156	9.02	0.0168
16	571	9.46	0.0166	10.2	0.0178
17	607	10.8	0.0178	11.4	0.0188
18	643	12.2	0.019	12.7	0.0197
19	679	13.7	0.0202	14	0.0207
20	714	15.2	0.0213	15.5	0.0216
21	750	16.7	0.0223	16.9	0.0226
22	786	19.6	0.025	18.5	0.0235
23	821	21.5	0.0262	20.1	0.0245
24	857	23.5	0.0275	21.8	0.0254
25	893	25.8	0.0289	23.5	0.0263
26	929	27.7	0.0299	25.3	0.0272
27	964	30.1	0.0312	27.1	0.0281
28	1000	32.2	0.0322	29.1	0.0291

ANEXO F: Diagrama de bloques Planta Piloto

Block Diagram of plant pilot

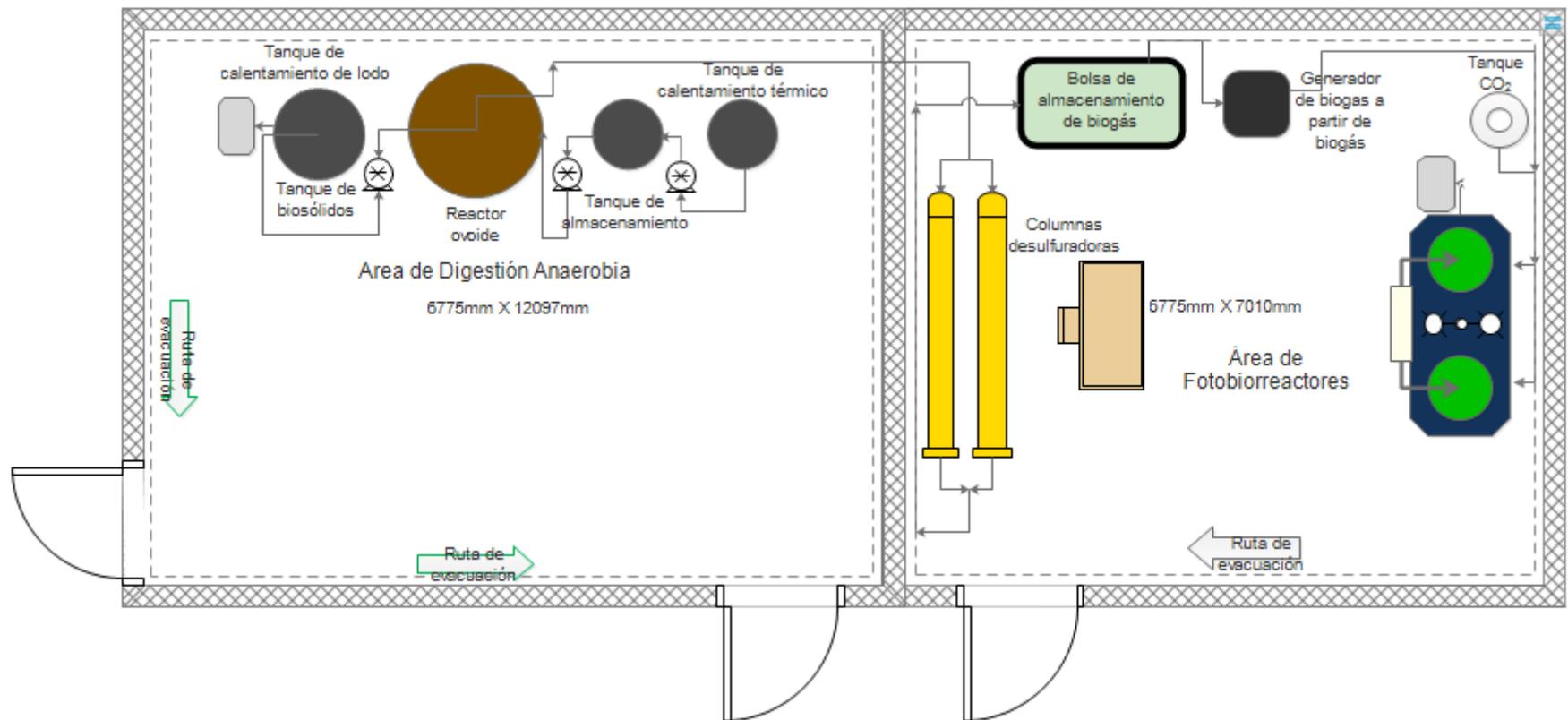


ANEXO G: Diagrama de flujo Planta Piloto

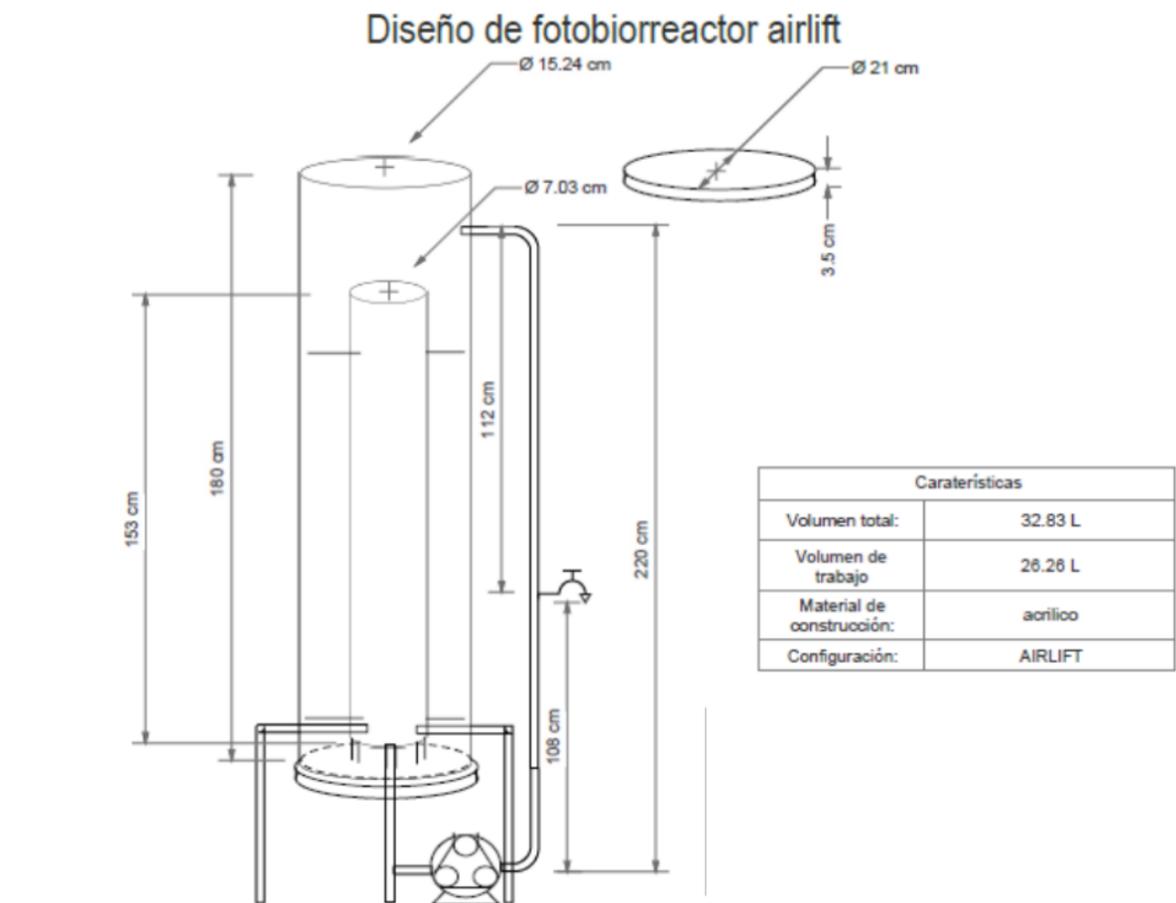


ANEXO H: Diseño de Planta Piloto

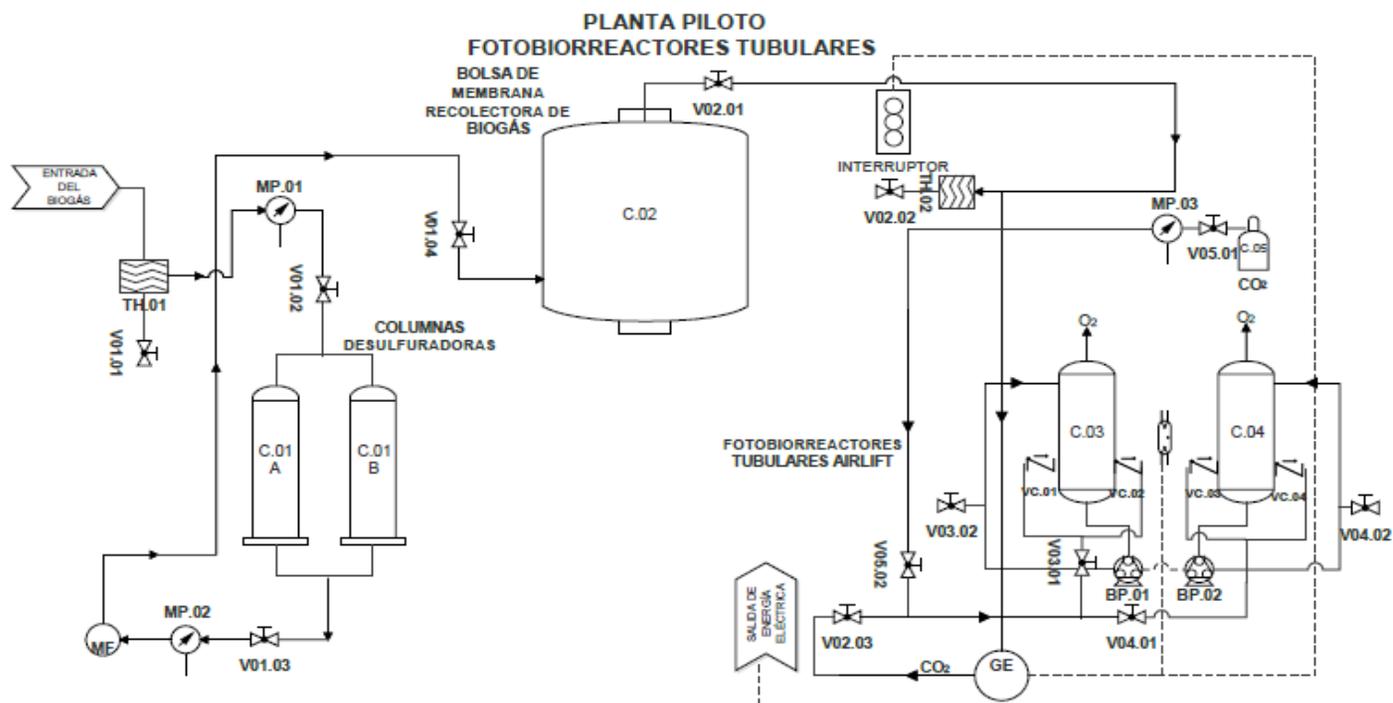
Plant pilot Layout



ANEXO I: Diagrama P&ID Planta Piloto



(Sección de Fotobiorreactores)



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ORIZABA

DIAGRAMA P&ID DE PLANTA PILOTO
CON FOTOBIORREACTORES
TUBULARES

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

ANEXO J: Diagrama AutoCAD

Sección Fotobiorreactores

