

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**



**Casa abierta al tiempo**

**Captura de CO<sub>2</sub> por una comunidad de microalgas obtenidas  
de un ecosistema natural mexicano.**

**T E S I S**

Para obtener el grado de  
Maestra en Biotecnología

**P R E S E N T A**

I.B.I. Alma Lilia Toledo Cervantes.

Director

Dr. Sergio Revah Moiseev.

Asesoras:

Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarria.

Dra. María Esther Meave Del castillo.

Marzo 2010

**“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma  
Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de  
Posgrados de Calidad del CONACyT”**

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis padres por impulsarme a ser mejor.

A mis hermanos Miguel y Jessica por creer en mí.

Al Dr. Sergio Revah por la oportunidad y confianza.

A la Dra. Marcia Morales por el apoyo y conocimientos brindados.

A la Dra. Ma. Esther Meave por la asesoría en la elaboración de esta tesis.

Al M en C. Sergio Hernández, el Dr. Armando González y el Dr. Guillermo Baquerizo, por sus recomendaciones en la elaboración de esta tesis.

A los miembros del jurado por la revisión y enriquecimiento de esta tesis.

En especial a mi amigo Hugo “Hans” León por su incondicional ayuda y compañía.

A mis amigos Mariana Franco, Carolina Anaya, Diana Alonso, Agustín Vargas, Luis Arellano, Betzabé Peña y Diego Bañales, por los momentos de relajación.

A los amigos del Laboratorio W107 y PPU4 (Georgina Cañas, Fernando Almengló, Uriel Cid, Gabriel Viguera, Cristal Zuñiga, Katia Dahmani, Arturo Ávila, Liz Dzul, Hélène Ipas, José Rocha y Ricardo Cruz), por la convivencia.

A CONACYT por el soporte de esta tesis.

## RESUMEN.

El objetivo de esta investigación fue caracterizar la captura de CO<sub>2</sub> y el crecimiento en un fotobiorreactor de una comunidad de algas obtenidas de la laguna de Churince, localizada a 19.5 Km al sur-oeste de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Al inicio de los experimentos se estudiaron dos configuraciones de reactores: columna de burbujas (BCR) y airlift (ALR). Las condiciones iniciales fueron: flujo de alimentación de 0.8 vvm con concentración de CO<sub>2</sub> al 5 y 10% CO<sub>2</sub> v/v y una intensidad de luz de 3260 Lx. En el experimento al 5% se obtuvo en el ALR una biomasa de 3.25 Kg m<sup>-3</sup> y en el BCR de 3.9 Kg m<sup>-3</sup>, bajo estas condiciones la máxima captura de CO<sub>2</sub> fue de: 20.8 y 17.13 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para el BCR y ALR, respectivamente. Cuando se alimentó la corriente gaseosa con CO<sub>2</sub> al 10%, la biomasa final obtenida fue 3.8 Kg m<sup>-3</sup> para el BCR y 2.55 Kg m<sup>-3</sup> para el ALR, así mismo las capturas de CO<sub>2</sub> máximas fueron de 21.98 y 26.38 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para el BCR y ALR, respectivamente. En ambos casos se observó la formación biopelículas dentro de las paredes del ALR, lo que ocasionó una disminución en la biomasa suspendida y, en la captura de CO<sub>2</sub>. Debido a la disminución de la actividad en el ALR se continuó con los experimentos solo en el BCR.

Durante la operación de los fotobiorreactores se observó que, la comunidad compuesta por microalgas de las divisiones Chlorophyta y Cyanobacteria se transformó en un cultivo prácticamente unialgal. La microalga predominante pertenece a la división: Chlorophyta, orden: Chlorococcales, familia: Coccomyxaceae, género: *Ourococcus* Grobety.

Se concluyó que incrementar la intensidad de luz a 8000 Lx permite aumentar los parámetros cinéticos de *Ourococcus* sp. (biomasa máxima  $X_{max}$ , tasa de máxima de crecimiento específico  $\mu_{max}$ , productividad máxima  $P_{max}$ , tasa de fijación de CO<sub>2</sub>  $P_{CO_2}$ ). La biomasa máxima registrada se obtuvo a 8000 Lx y 5% de CO<sub>2</sub> (6 Kg m<sup>-3</sup>), sin embargo también se observó una disminución en los porcentajes de remoción

(%R<sub>CO<sub>2</sub></sub>) y la capacidad de captura de CO<sub>2</sub> en el sistema (CE). La CE se incrementó al suministrar una mayor carga, sin embargo no se observó un incremento en la P<sub>max</sub>. Por otro lado, se observó que incrementar el flujo de entrada a 0.8 vvm indujo mayor productividad y concentración de biomasa. Además la mayor P<sub>CO<sub>2</sub></sub>, %R<sub>CO<sub>2</sub></sub> y la máxima CE se logró a 10% CO<sub>2</sub>, 5620 Lx y flujo de 0.8 vvm. En estos experimentos no se observó inhibición por la cantidad de CO<sub>2</sub> suministrado, *Ourococcus* sp. crece con corrientes gaseosas enriquecidas con 10% y con cargas de CO<sub>2</sub> de hasta 160 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. El máximo %R<sub>CO<sub>2</sub></sub> obtenido fue 25% con suministro de 10% CO<sub>2</sub> v/v a 0.4 vvm. Las P<sub>CO<sub>2</sub></sub> con respecto a la biomasa y la P<sub>max</sub> medida en algunas especies de microalgas utilizadas en la remoción de CO<sub>2</sub> de corrientes gaseosas son menores a las obtenidas en este estudio, por ejemplo de Morais y Costa (2007c) obtuvieron con *Chlorella kessleri* Fott et Nováková, una P<sub>CO<sub>2</sub></sub> de 0.163 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> y P<sub>max</sub> de 0.087 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, además en 2007a, con *Spirulina* sp. obtuvieron una P<sub>CO<sub>2</sub></sub> de 0.413 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> y P<sub>max</sub> de 0.22 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, mientras que con *Ourococcus* sp. se obtienen P<sub>CO<sub>2</sub></sub> de 0.92 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> y P<sub>max</sub> de 0.517 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>.

Por otro lado, *Ourococcus* sp. contiene 20-30 % de aceites con respecto a su peso seco, por lo tanto se cree que puede tener potencial biotecnológico para la obtención de aceites.

**ABSTRACT.**

The aim of this research was to characterize the CO<sub>2</sub> capture and growth in a photobioreactor using microalgae cultures. The biological material was obtained from the lake Poza Churince located 19.5 km southwest from Cuatro Ciéneas. Bubble column reactor (BCR) and airlift reactor (ALR) were used throughout the study. The reactors were fed with air streams at 0.8 vvm with 5 and 10% of CO<sub>2</sub> v/v and a light exposition of 3260 Lux. After 19 days, 3.25 Kg m<sup>-3</sup> and 3.9 Kg m<sup>-3</sup> of biomass was obtaining for the ALR and BCR, respectively operating at 5% of CO<sub>2</sub>. Maximum CO<sub>2</sub> capture rates were 17.13 and 20.8 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> for the ALR and BCR, respectively. When feeding at 10% CO<sub>2</sub> stream, the final biomass content was determined to be 3.8 and 2.6 Kg m<sup>-3</sup> for the BCR and ALR, meanwhile the respective maximum CO<sub>2</sub> capture rates were 21.98 and 26.38 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. In both operation conditions, biofilm attachment was observed on the ALR walls. Conversely the attachment was not detected for the BCR, causing a decrease in biomass concentration and a lower CO<sub>2</sub> capture. Because of the decreased activity in the ALR due to biofilm attachment, it was decided to continue experiments only in the BCR.

Additionally, it was observed that the microalgal community composed of Chlorophyta and Cyanobacteria turned into a unialgal culture. It was concluded that the microalga dominant belongs to the division: Chlorophyta, order: Chlorococcales, family Coccomyxaceae, genus: *Ourococcus* Grobety.

It was concluded that increasing the light intensity of 8000 Lx cause an increment in the kinetic parameters of *Ourococcus* sp. ( $X_{max}$ , maximum biomass;  $\mu_{max}$ , specific maximum growth rate;  $P_{max}$ , maximum productivity;  $P_{CO_2}$ , CO<sub>2</sub> fixation rate). Maximum biomass was obtained at 8000 Lx and 5% CO<sub>2</sub> (6 Kg m<sup>-3</sup>). However a reduction in the removal rates (% R<sub>CO<sub>2</sub></sub>) and the elimination capacity in the system (EC) was observed at this operation condition. High CO<sub>2</sub> feeding rates promote higher

carbon captures. Nevertheless enhancement in  $P_{\max}$  was not obtained at high  $\text{CO}_2$  feeding rate. Additionally, a flow at 0.8 vvm increased productivity and biomass concentration. The maximum  $\text{CO}_2$  fixation rate, removal rate and elimination capacity was attained at 10%  $\text{CO}_2$ , 5620 Lx and flow at 0.8 vvm. No inhibition was observed operating a gas streams with 10%  $\text{CO}_2$  and loading rate up to  $160 \text{ Kg CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . The maximum  $\%R_{\text{CO}_2}$  was 25% supplying 10%  $\text{CO}_2$  at 0.4 vvm and 5620 Lx. The  $P_{\text{CO}_2}$  and  $P_{\max}$  using microalgae are lower than those obtained in this study. For example, de Morais and Costa (2007c) observed that *Chlorella kessleri* Fott et Nováková shows a  $P_{\text{CO}_2}$  of  $0.163 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  and  $P_{\max}$  of  $0.087 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , also in 2007a with *Spirulina* sp. same authors obtained a  $P_{\text{CO}_2}$  of  $0.413 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  and a  $P_{\max}$  of  $0.22 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . In this study using *Ourococcus* sp. a  $P_{\text{CO}_2}$  of  $0.92 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  and a  $P_{\max}$  of  $0.517 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  was obtained.

On the other hand, *Ourococcus* sp. shows the ability to store up to a 20-30% of its dry weight as oil. Therefore these algae can be used as raw material to obtain oil, since a productivity of  $0.5 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  with a maximum biomass of  $6 \text{ Kg m}^{-3}$  was obtained.

## ÍNDICE.

RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. El calentamiento global.....	3
1.1.1. Gases de efecto invernadero.....	4
1.1.2. Papel del CO <sub>2</sub> en la atmósfera.....	5
1.1.3. Métodos de reducción de la concentración de CO <sub>2</sub> .....	7
1.1.3.1. Fijación biológica del CO <sub>2</sub> .....	8
1.2. Microalgas.....	10
1.2.1. Características generales.....	11
1.2.2. Fotosíntesis (captura y fijación del CO <sub>2</sub> ).....	15
1.2.3. Usos y aplicaciones de las microalgas.....	20
1.3. Sistemas de cultivo de microalgas.....	26
1.3.1. Características de los fotobiorreactores.....	28
1.3.2. Fotobiorreactores utilizados en la fijación de CO <sub>2</sub> .....	34
CAPITULO 2. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	39
CAPITULO 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	42
3.1. Justificación.....	42
3.2. Objetivo general.....	43
3.3. Objetivos particulares.....	43
CAPITULO 4. HIPÓTESIS.....	44
CAPITULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
5.1 Microalgas.....	45
5.2. Propagación y medio de cultivo.....	46
5.3. Sistema experimental y parámetros de operación.....	46
5.4. Limpieza de los reactores.....	49
5.5. Definición de los parámetros cinéticos y de captura de CO <sub>2</sub> .....	49
5.6. Determinaciones analíticas.....	51
5.6.1. Velocidad de flujo y monitoreo del CO <sub>2</sub> .....	51
5.6.2. Medición de la intensidad de luz.....	52
5.6.3. Análisis del carbono total.....	52
5.6.4. Monitoreo del pH y temperatura.....	52
5.6.5. Determinación de la biomasa.....	53
5.6.6. Recuperación de la biomasa.....	53
5.6.7. Cuantificación y extracción de los aceites.....	54
CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55

---

6.1 Elección del sistema.....	55
6.2 Identificación. ....	60
6.3 Efecto de la irradiancia. ....	64
6.4 Efecto del flujo de aire. ....	68
6.5 Efecto de la carga y concentración de CO <sub>2</sub> . ....	73
6.6 Contenido de aceites.....	75
6.7 Balances de carbono y nitrógeno. ....	77
CAPITULO 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	80
7.1. Conclusiones.....	80
7.2. Perspectivas.....	81
CAPITULO 8. REFERENCIAS.....	83
ANEXOS.....	89
1. Pruebas estadísticas para la intensidad de luz suministrando 5 y 10% CO <sub>2</sub> .....	89
A) Normalidad de los errores.....	90
B) Estadísticos descriptivos.....	91
C) Homogeneidad de varianzas. ....	93
D) Análisis de varianza.....	94
E) Pruebas pos hoc.....	96
2. Pruebas estadísticas para el flujo e intensidad de luz suministrando 5 y 10% CO <sub>2</sub> . ....	98
A) Normalidad de los errores.....	99
B) Estadísticos descriptivos.....	99
C) Homogeneidad de varianzas. ....	101
D) Análisis de varianza.....	103
E) Pruebas pos hoc.....	104

## INTRODUCCIÓN

El calentamiento global es un aumento en la temperatura provocado por el efecto invernadero, el cual es un proceso natural debido a la existencia de gases en la atmósfera que actúan permitiendo el paso de la radiación solar hacia la Tierra pero reteniendo parte de la radiación solar reflejada por la superficie terrestre, y sin el cual la vida en la tierra no existiría.

En la actualidad se presenta un problema, la posible existencia de un efecto invernadero intensificado por la emisión de gases provocados por la actividad humana, al quemar combustibles como el petróleo, el carbón y el gas natural, se habla así entonces de un efecto invernadero antropógeno. Los principales gases causantes son: el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), ozono, metano, los clorofluorocarbonos y el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), desde la Revolución Industrial y debido principalmente al uso intensivo de los combustibles fósiles en las actividades industriales y el transporte, se han producido sensibles incrementos en las cantidades de  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{CO}_2$  emitidas a la atmósfera, con el agravante de que otras actividades humanas, como la deforestación, han limitado la capacidad regenerativa de la atmósfera para eliminar el  $\text{CO}_2$ , principal responsable del efecto invernadero.

Una de las alternativas para disminuir la concentración del  $\text{CO}_2$ , puede ser la fijación por medio de microorganismos fotosintéticos, como las microalgas que se desarrollan naturalmente en medios acuáticos, tanto de aguas dulces como salobres. Las microalgas utilizan el  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono para la síntesis de componentes orgánicos; comúnmente el cultivo de microalgas se realiza en tanques abiertos utilizando luz natural o artificial, que requieren de grandes áreas de cultivo, sin embargo, este método presenta ciertas desventajas, como las dificultades en el control de las condiciones de cultivo, evaporación del medio y la disminución de la intensidad de luz cuando se incrementa la profundidad, una alternativa a esto, es el

uso de los fotobiorreactores tubulares, que permiten el cultivo en un sistema cerrado, previenen la contaminación y facilitan el control de los distintos factores de producción. Los reactores ALR y BCR (*airlift reactor* y *bubble column reactor* respectivamente) son ejemplos de fotobiorreactores verticales tubulares, que se fabrican regularmente de polietileno o tubos de vidrio, para permitir la buena penetración de la luz, a su vez el aire, que es bombeado desde el fondo del reactor provee un buen mezclado, el suficiente suministro de CO<sub>2</sub> y la eficiente remoción del oxígeno (O<sub>2</sub>). Estos sistemas son utilizados para llevar a cabo reacciones de fotosíntesis en las que el CO<sub>2</sub> es transferido a la fase acuosa, donde ocurre la conversión, y el resultado es la producción de O<sub>2</sub>, biomasa, biopolímeros solubles y algunos químicos como el carbonato y el bicarbonato.

México se encuentra entre los primeros lugares en términos de biodiversidad, un sitio interesante en términos de biodiversidad es Cuatro Ciénegas, Coahuila, debido a que sus cuerpos de agua contienen especies poco estudiadas y endémicas, que están adaptadas a vivir en condiciones extremas, como la carencia de fósforo y la alta incidencia de radiación solar (Souza *et al.*, 2004), el estudio de la captura de CO<sub>2</sub> por una comunidad de microalgas obtenidas de un ecosistema natural mexicano, representa una alternativa para generar nuevos conocimientos sobre la captura de CO<sub>2</sub> en fotobiorreactores.

## **CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO.**

En este capítulo se describe la problemática sobre el calentamiento global y el papel que juega en ello el dióxido de carbono, por otro lado, el uso de microalgas es una alternativa para mitigar la concentración de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en la atmósfera, por tanto se incluyen las características generales de las microalgas, ruta de fijación del CO<sub>2</sub> (fotosíntesis) y su cultivo en fotobiorreactores.

### **1.1. El calentamiento global.**

La Tierra absorbe la radiación electromagnética proveniente del Sol, principalmente en la superficie y la distribuye por movimientos atmosféricos y oceánicos, una parte es re-emitida al espacio con lo cual, se mantiene un balance entre la energía recibida y re-emitida. Cualquier proceso que altere tal balance, ya sea por cambios en la radiación recibida y re-emitida o en su distribución en la tierra, se reflejará como cambios en el clima. El incremento en la concentración de los llamados gases de efecto invernadero reducen la eficiencia con la cual la Tierra re-emite la energía recibida al espacio, y parte de la energía que debería ser enviada al espacio no logra salir por la presencia de esos gases. Por tanto la temperatura de la superficie terrestre se eleva con el fin de emitir más energía, y aunque parte quede atrapada, suficiente energía saldrá al espacio para alcanzar el balance radiativo que mantiene estable el clima del planeta. Por ello, si las concentraciones de los gases de efecto invernadero continúan aumentando, la temperatura de la superficie del planeta seguirá incrementándose, y aún cuando las emisiones de estos gases se estabilizaran, los efectos del calentamiento perdurarían, pues este tipo de gases tienden a permanecer por largos periodos en la atmósfera (Martínez y Fernández, 2004).

La atmósfera de la Tierra es una fina capa de gases, partículas y nubes que rodean el planeta, y en ella se vierten varios miles de millones de toneladas de contaminantes cada año. Las principales fuentes de contaminación son la quema de combustibles sólidos y fósiles, para la generación de energía, el transporte y la quema de los bosques. El producto de todas las formas de quema de combustibles es el CO<sub>2</sub>, pero existen también otros productos de la combustión incompleta, como el monóxido de carbono (CO) y los óxidos nitrosos (NO<sub>x</sub>), que pueden reaccionar con otras especies de gases en la atmósfera (Ramanathan y Feng, 2009).

#### *1.1.1. Gases de efecto invernadero.*

El oxígeno (O<sub>2</sub>) y el nitrógeno (N<sub>2</sub>) son los principales componentes de la atmósfera: el O<sub>2</sub> constituyendo el 21 % y el N<sub>2</sub>, 78%. Los gases de efecto invernadero corresponden al 1% restante de la composición atmosférica y en general están constituidos por tres o más átomos; los más importantes son el vapor de agua (H<sub>2</sub>O) y el CO<sub>2</sub>; los demás gases como el metano (CH<sub>4</sub>), los NO<sub>x</sub> y los compuestos clorofluorocarbonados (CFCs) son gases traza en la atmósfera. Aquéllos que forman moléculas diatómicas o monoatómicas (O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>) son transparentes a la radiación terrestre. El efecto invernadero es resultado de que la atmósfera deje pasar los rayos solares y parte de ellos sean absorbidos por la superficie terrestre, que entonces se calienta y en consecuencia emite radiación terrestre que es absorbida por la atmósfera. El efecto invernadero siempre ha existido y gracias a ello existe la vida en la Tierra tal y como la conocemos, sin embargo en los últimos siglos este balance, ha sido alterado como consecuencia del desarrollo humano, ya que la industrialización ha inyectado a la atmósfera CO<sub>2</sub> y gases traza. El incremento del CO<sub>2</sub> se da por la quema de combustibles fósiles (petróleo, gas natural, carbón mineral) y la deforestación. Los gases traza son emitidos por artefactos y actividades industriales, domésticas, agropecuarias, etc. Con excepción de los CFCs, los gases de efecto invernadero se han encontrado de forma natural en el aire, sin embargo, el hombre

ha provocado el incremento en las concentraciones de tales gases debido a sus diferentes actividades, causando un incremento en la temperatura atmosférica, debido al calentamiento global o cambio climático (Martínez y Fernández, 2004).

Según la Agencia de Protección ambiental (EPA, por sus siglas en inglés), el CO<sub>2</sub> contribuye con el 80% del total de todos los gases de efecto invernadero, seguido por el CH<sub>4</sub> con concentraciones atmosféricas de 1774 ± 1.8 ppb, este gas es 20 veces más efectivo atrapando la energía que el CO<sub>2</sub>, y permanece en la atmosfera de 9-15 años. El metano es emitido durante la producción y el transporte de carbón, gas natural y petróleo. Además, son el resultado de la ganadería, prácticas agrícolas y por la descomposición de residuos orgánicos en los vertederos municipales. Se estima que el 20% de las emisiones de metano son generadas por el todo el ganado del planeta. En 2005, las emisiones de todos los gases de efecto invernadero, se estimaron en 44,153 millones de toneladas de CO<sub>2</sub> equivalentes, de las cuales el 15% fueron de metano (Rasmussen, 2009).

### *1.1.2. Papel del CO<sub>2</sub> en la atmósfera.*

Los dos átomos de oxígeno en el CO<sub>2</sub> vibran junto con el átomo de carbono y la frecuencia de esta vibración coincide con algunas de las longitudes de onda del infrarrojo de la radiación de onda larga. Cuando la frecuencia de la radiación emitida por la superficie de la Tierra y la atmósfera coinciden con la frecuencia de vibración del CO<sub>2</sub>, la radiación es absorbida por el CO<sub>2</sub> y convertida en calor por la colisión con otras moléculas de aire y después es devuelta a la superficie. Como resultado de esta captura, la radiación saliente se reduce por el aumento del CO<sub>2</sub>, y como éste se ha incrementado con el tiempo (figura 1), se ha acumulado en exceso la energía en el planeta. Dado que la vida media de una molécula de CO<sub>2</sub> en la atmósfera es de un siglo o más, actualmente miles de millones de toneladas de CO<sub>2</sub> antropogénico cubren de manera uniforme al planeta (Ramanathan y Feng, 2009).

Desde 1850, debido a la industrialización, la cantidad de CO<sub>2</sub> en la atmósfera se ha incrementado de 280 a aproximadamente 380 ppm (partes por millón). Actualmente la concentración de este gas es más alta de lo que había sido en los últimos 20 millones de años. El incremento en la tasa de producción de CO<sub>2</sub> es cercano al triple, con respecto a la tasa promedio registrada en 1990. Las emisiones crecen anualmente en promedio 3.1 % desde el año 2000, en vez de 1.1 % como ocurriera en los años 90's., excediendo así los escenarios más pesimistas presentados en el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático, IPCC por sus siglas en inglés (Johansen, 2008).

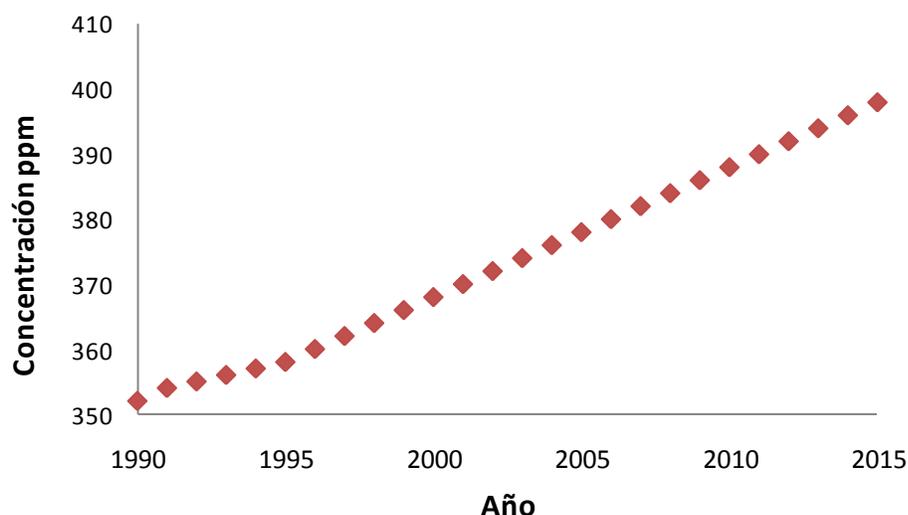


Figura 1. Concentración atmosférica del CO<sub>2</sub> y proyecciones al 2015, adaptada de [http://www.ipcc-data.org/ddc\\_co2.html](http://www.ipcc-data.org/ddc_co2.html).

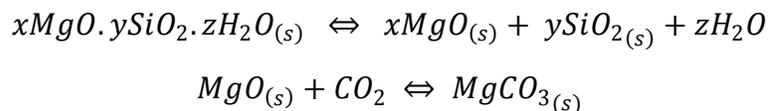
El IPCC ha advertido sobre el requerimiento de acciones inmediatas para evitar nuevos incrementos en los niveles atmosféricos existentes hoy en día, pues en ausencia de medidas rápidas y eficaces para controlar la situación, para el año 2100 se prevé que las concentraciones del CO<sub>2</sub> aumenten hasta 550 ppm, o por encima de 830 ppm en el escenario más pesimista (Evans y Furlong, 2003).

### 1.1.3. Métodos de reducción de la concentración de CO<sub>2</sub>.

La Organización de las Naciones Unidas promovió el protocolo de Kyoto en 1997, con el objeto de reducir las emisiones de los gases de efecto invernadero. Las estrategias para reducir el CO<sub>2</sub>, pueden ser aplicadas sobre el contenido en la atmósfera (reforestación, cultivo de macroalgas en el océano, etc.) o sobre las emisiones de las industrias (generalmente emitidas por combustión para obtención de energía, las cuales contienen entre 12-15% v/v de CO<sub>2</sub>) (Wang *et al.*, 2008).

Entre las técnicas de captura de CO<sub>2</sub> de fuentes fijas existen procesos químicos y biológicos, a continuación se describen algunos métodos químicos.

*Carbonatación mineral.* Se refiere a la fijación de CO<sub>2</sub> mediante óxidos alcalinos y alcalinotérreos, como los óxidos de magnesio (MgO) o calcio (CaO). Las reacciones entre estos materiales y el CO<sub>2</sub> producen compuestos como el carbonato de magnesio (MgCO<sub>3</sub>) y el carbonato cálcico (CaCO<sub>3</sub>). La cantidad de óxidos metálicos que se encuentra en las rocas de silicatos de la corteza terrestre es la necesaria para fijar todo el CO<sub>2</sub> que produciría la combustión de las reservas de combustibles fósiles existentes. La fijación del CO<sub>2</sub> puede entonces resumirse en dos reacciones: (Zevenhoven *et al.*, 2006)



La carbonatación mineral produce sílice y carbonatos que se mantienen estables durante largos períodos y que, por lo tanto, pueden almacenarse en las minas de silicato o pueden reutilizarse. El proceso de carbonatación mineral se produce de forma natural y se conoce como “meteorización”. En la naturaleza, el proceso es muy lento, por lo que debe ser acelerado de forma considerable a fin de convertirlo en un método de almacenamiento viable para el CO<sub>2</sub> procedente de fuentes antropogénicas (IPCC, 2005).

Los *sumideros* de carbono pueden ser naturales o artificiales, la captación de CO<sub>2</sub> atmosférico por parte de la vegetación terrestre y su acumulación en los sedimentos de lagos y océanos es un proceso natural, que actualmente almacena gran parte del CO<sub>2</sub> emitido por la actividad humana. También se han desarrollado tecnologías que consisten en la separación, transporte y almacenamiento a largo plazo, lo que sería un sumidero forzado que el IPCC considera como una de las opciones de mitigación para la estabilización de las concentraciones de los gases de efecto invernadero.

*Captación y el almacenamiento de CO<sub>2</sub> (CAC)*. Consiste en la separación del CO<sub>2</sub> emitido por la industria y fuentes relacionadas con la generación de energía, su transporte a un lugar de almacenamiento y su aislamiento de la atmósfera en formaciones geológicas del subsuelo, océanos o bajo otras condiciones. La CAC tiene la capacidad potencial de reducir los costos generales de la mitigación y aumentar la flexibilidad para lograr la reducción de las emisiones de CO<sub>2</sub>. A escala mundial, las emisiones de CO<sub>2</sub> causadas por la utilización de combustibles fósiles en el año 2000 ascendieron a un total aproximado de 23.5 gigatoneladas (Gt) de CO<sub>2</sub> al año, de los cuales, cerca del 60 % correspondió a fuentes fijas. No obstante, no todas estas fuentes son convenientes para la captación de CO<sub>2</sub> (IPCC, 2005).

Otras opciones de mitigación comprenden la mejora de la eficiencia energética, la preferencia de combustibles que dependan menos intensivamente del carbono, la energía nuclear, las fuentes de energía renovables, el perfeccionamiento de los sumideros biológicos, la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero diferentes al CO<sub>2</sub> y la aplicación de procesos biológicos.

#### *1.1.3.1. Fijación biológica del CO<sub>2</sub>.*

Los sumideros naturales de CO<sub>2</sub>, que son parte del ciclo natural del carbono constituyen el sistema más eficiente de control de este gas en la atmósfera. El ciclo

global del carbono consta de tres principales reservas de carbono: la atmosférica, la oceánica y la terrestre. El ciclo comienza con la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico a través de los procesos de fotosíntesis, realizados por plantas y algas. Estos organismos incorporan el CO<sub>2</sub> atmosférico a los procesos metabólicos para la formación de materia orgánica y oxígeno, a la larga esta materia orgánica es degradada e incorporada de nuevo al ciclo del carbono. Una parte importante del ciclo es el fenómeno de sustracción de cierta parte del carbono por trastornos geológicos, las obras de minería o perforación realizadas por el hombre que llevan a la superficie el carbón o petróleo, que será quemado y convertido en CO<sub>2</sub>. La mayor parte del carbono del planeta, se encuentra en forma de carbonatos, como por ejemplo: la piedra caliza y el mármol. Al desgastarse las rocas con el tiempo los carbonatos vuelven al ciclo del carbono. Sin embargo, en el fondo del mar se forman otras rocas debido a los sedimentos de animales y plantas muertas, así la cantidad de carbono en el ciclo deberá permanecer prácticamente constante.

El secuestro de CO<sub>2</sub> por parte del océano tiene lugar por medio de procesos fisicoquímicos y biológicos. La parte física se da por el intercambio del CO<sub>2</sub> en la interfase atmósfera-océano, ya que la presión parcial del CO<sub>2</sub> tiende a estar en equilibrio entre la atmósfera y el océano, por tanto el aumento en la concentración atmosférica impulsa el flujo hacia el océano. El proceso biológico o fijación fotosintética se lleva a cabo en la zona eufótica del océano por el fitoplancton. Dicha actividad biológica retira entonces el CO<sub>2</sub> de las aguas superficiales y lo transporta hacia el interior del océano en forma de carbono orgánico y carbonatos. Los océanos absorben aproximadamente 93 Gt año, y secuestran grandes cantidades de carbono (38,500 Gt). Por otro lado la vegetación terrestre también absorbe alrededor de 110 Gt año, sin embargo la eficiencia fotosintética (energía luminosa captada que es convertida a energía química) de la vegetación acuática, resulta mucho mayor que la terrestre, ya que se estima que la agricultura sólo contribuye con la reducción de un 3-6 % de las emisiones fósiles.

El cultivo de macroalgas en estanques, lagos u océanos, ha sido propuesto como otro método de reducción de las emisiones de CO<sub>2</sub>, ya que es difícil optimizar el crecimiento en cultivos abiertos, porque resultan en una baja productividad. Sin embargo, tienen como ventaja que puede ser utilizado en conjunto con el tratamiento de aguas residuales. Las microalgas han recibido mucha más atención con respecto a las macroalgas en la fijación de CO<sub>2</sub>, debido a que se adaptan fácilmente a crecer en biorreactores y por el conocimiento que se tiene sobre muchas cepas usadas en acuicultura (Aresta *et al.*, 2005; Evans y Furlong 2003; Skjanes *et al.*, 2007).

## **1.2. Microalgas.**

*Fitoplancton*, es el conjunto de microalgas que viven suspendidas en la columna de agua y a merced de sus movimientos, parcial o totalmente. Las características adaptativas que presentan las microalgas planctónicas están relacionadas con la resistencia al hundimiento y con la habilidad de absorber rápidamente los nutrientes y acumularlos intracelularmente para sobrevivir a su escasez. Los ciclos de vida de las algas son cortos y frecuentemente incluyen la formación de esporas de resistencia o de células de reposo, con lo cual sobreviven durante periodos desfavorables. Su nutrición es por absorción en forma iónica de C, H, O, N, P, S, K, Ca, Fe, Mg, y de cantidades traza de Mn, B, Co, Cu, Zn y Mo, sin embargo, para algunas especies son necesarias otras moléculas inorgánicas y orgánicas complejas, incluyendo la vitamina B<sub>12</sub>. De los grupos que conforman el fitoplancton, las pertenecientes a las divisiones Cyanobacteria, Chlorophyta, Heterokontophyta y Euglenophyta son las más comunes en aguas dulces, mientras que las Bacilliarophyta, las Dinophyta y las Haptophyta abundan en el mar (Lara, 1996).

Existen dos tipos de microalgas, procariotas y eucariotas. Las microalgas procariotas o Cyanobacteria carecen de organelos limitados por una membrana y tienen ribosomas más pequeños; Las microalgas eucariotas se definen por la presencia de

una doble membrana en el núcleo y organelos como los cloroplastos. Muchas microalgas son unicelulares no móviles, mientras que otras poseen uno o más mecanismos de locomoción, flagelos o flujos de mucilago a través de poros en la pared, con los cuales pueden realizar migraciones verticales en los cuerpos de agua. Estructuras de locomoción como los flagelos se presenta en algas celulares o coloniales. Una colonia es un conjunto de células de diferentes generaciones, comunicadas entre sí, cuyo número y disposición de células permanece constante a través de la vida del individuo. Un cenobio es un conjunto de células hermanas flageladas o no móviles, cuyo número de células no permanece constante, y las cuales no están comunicadas entre sí (Graham y Wilcox, 2000).

#### 1.2.1. Características generales.

La estructura básica del aparato fotosintético en las microalgas son los *cloroplastos*, los cuales contienen una serie de vesículas membranosas aplastadas llamadas *tilacoides*, rodeados de una matriz o *estroma*. Los tilacoides contienen la clorofila y son el sitio donde se llevan a cabo las reacciones fotoquímicas, mientras que la fijación de CO<sub>2</sub> ocurre en el estroma. Los tilacoides se ensamblan en grupos de tres (Heterokontophyta y Euglenophyta), cinco a nueve (Chlorophyta) o bien pueden estar aislados (Rhodophyta). Los cloroplastos son notables y varían en su forma, pueden ser discoidales, en forma de banda, estrella, red o copa. En algunas algas los cloroplastos son parietales (situados junto a la pared celular), centrales (axiales) o extendidos desde el centro de la célula (radiales). La morfología de los cloroplastos se utiliza en la taxonomía de varios grupos de microalgas. El *pirenoide* es una región constituida por proteínas, dentro del cloroplasto con mayor densidad que el estroma, que puede o no ser atravesada por los tilacoides. El pirenoide es frecuentemente asociado con la producción de sustancias de reserva, en especial almidón ya que se ha observado una alta concentración de la enzima amilasa en su interior; También se ha determinado que, en la mayoría de las microalgas, la enzima ribulosa-1,5-disfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) se concentra en los carboxisomas de las

Cyanobacteria y en el pirenoide de las algas eucariotas (Dawes, 1991; Lee, 1999; Graham y Wilcox, 2000).

Existen tres tipos principales de pigmentos, las clorofilas, los carotenoides (que incluyen a las xantofilas) y las ficobilinas. Las algas fotosintéticas tienen clorofila en sus cloroplastos. Las clorofilas son tetrapirroles que están dispuestos en un anillo con un átomo central de magnesio con una cadena de fitol y que se presenta en cuatro formas *a*, *b*, *c* ( $c_1$  y  $c_2$ ) y *d*. En todas las microalgas la clorofila *a* es el principal pigmento fotosintético y varía en cantidad de 0.3 a 3 % de su peso seco. Los carotenoides son pigmentos amarillos, anaranjados o rojos y en general se pueden dividir en dos clases: 1) los carotenos que son cadenas complejas de hidrocarburos libres de oxígeno y 2) sus derivados oxigenados oxantofilas. Los carotenos son insaturados y transmiten principalmente la luz amarilla. Las xantofilas presentan cierto grado de saturación con oxígeno y transmiten más en las longitudes de onda roja o naranja. El caroteno que más abunda en las microalgas es el  $\beta$ -caroteno. Al igual que las clorofilas, las ficobilinas son tetrapirroles lineares, pero carecen de magnesio y de una cadena de fitol. Las ficobilinas están unidas a proteínas, por lo que se denominan comúnmente ficobiliproteínas. Existen dos clases de ficobiliproteínas: la ficoeritrina y ficocianina, la primera transmite la luz roja y la segunda azul, y son características de las Rhodophyta y Cyanobacteria. Se presentan distintos tipos de reservas fotosintéticas en las microalgas: 1) los polímeros de los  $\alpha$  (1→4) glucanos, como el almidón de las Chlorophyta compuesto por amilosa y amilopectina, 2) los polímeros de los  $\beta$  (1→3) glucanos, como la laminarina de las Heterokontophyta, 3) compuestos de bajo peso molecular como los azúcares, polioles y glucósidos (Dawes, 1991; Lee, 1999).

### Reproducción.

En las algas se utilizan algunos términos en general para referirse a las células reproductivas. En la reproducción vegetativa, las esporas son células que germinan sin fusión, para formar un nuevo individuo. Las aplanosporas son esporas no

móviles, mientras que las zoosporas son células reproductivas flageladas que se producen dentro de la célula vegetativa; las autosporas y monosporas son también células no móviles, pero que carecen de la capacidad de desarrollarse en zoosporas. Los procesos de reproducción asexual son muy variados, por bipartición (división celular longitudinal o transversa), formación de zoosporas o aplanosporas, producción de autosporas o monosporas, formación de autocolonias (o formación de cenobios), fragmentación (ruptura de los filamentos) y formación de acinetos (células vegetativas con una gruesa pared celular y alto contenido de sustancias de reserva, usualmente conocidas como estructuras de resistencia) (Graham y Wilcox, 2000)

En la reproducción sexual, las microalgas tienen diferentes vías, desde la fusión de los gametos (haploides, plasmogamia) hasta que se logra la fusión nuclear (cariogamia) para formar un cigoto diploide. La reproducción sexual puede ser isogamia, anisógamia u oogamia; también puede ser esporica, gamética, cigótica o somática.

#### Factores limitantes.

Para el crecimiento de cualquier organismo fotosintético se requiere, luz, CO<sub>2</sub>, agua, nutrientes minerales en solución y una temperatura ambiente adecuada para la actividad metabólica. Cuando el suministro de CO<sub>2</sub> y agua no son limitantes, factores como la temperatura, iluminación, turbulencia, viscosidad del agua y la tasa de renovación del agua son importantes para las microalgas. Todas las especies tienen rangos óptimos de desarrollo según las características de luz y temperatura; cuando estos factores cambian, las poblaciones existentes adaptadas a estas condiciones disminuyen o incluso desaparecen, y son sustituidas por otras especies adaptadas a las nuevas características.

#### Clasificación.

Las microalgas se clasifican en varias divisiones: Cyanobacteria, Chlorophyta, Rhodophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Prymnesiophyta y

Heterokontophyta, de estas a continuación se hace una descripción de las más relevantes en agua dulce:

*Cyanobacteria*: los organismos de esta división se distinguen de las demás clases de algas por ser procariotas. Por su tipo de organización pueden ser unicelulares, coloniales o filamentosas. Las Cyanobacterias filamentosas poseen células especializadas llamadas heterocistos, en las que se lleva a cabo la fijación del nitrógeno. El citoplasma no suele presentar estructuras reconocibles salvo carboxisomas (corpúsculos que almacenan la enzima Rubisco), aerotopos (estructuras llenas de gas) y tilacoides. Contienen clorofila *a* y pigmentos accesorios como las ficobilinas y carotenoides, en general la ficocianina y la ficoeritrina son los pigmentos accesorio dominantes y proporcionan el color verde-azul y rojizo de estas algas. Los productos de almacenamiento son generalmente glucanos  $\alpha$  (1→4) y se desarrollan tanto en agua dulces como salobres. La reproducción sexual no se presenta en este grupo (Dawes, 1991; Lee, 1999; Graham y Wilcox, 2000).

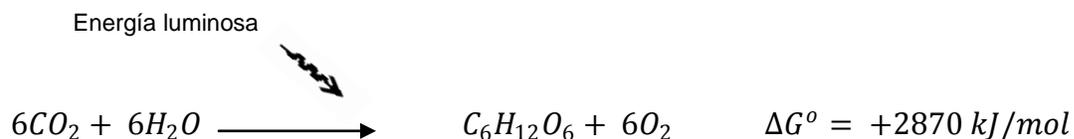
*Chlorophyta*: los organismos pertenecientes a esta división son conocidos como algas verdes, las células flageladas generalmente son solitarias y se desarrollan en aguas dulces y marinas. Los cloroplastos contienen clorofila, *a*, *b*, y  $\beta$ -caroteno entre otros carotenoides. Las Chlorophyta difieren de las otras algas eucariotas, entre otras características, porque forman sus productos de almacenamiento (comúnmente almidón) dentro del cloroplasto y en relación con el pirenoide. Su reproducción es tanto sexual como asexual; entre los tipos de reproducción asexual que presentan están la fragmentación, la zoosporogénesis y la formación de aplanosporas y autosporas (células con la misma forma que la célula madre que son comunes en las Chlorococcales). La reproducción sexual puede ser por isogamia, anisogamia u oogamia (Dawes, 1991; Lee, 1999; Graham y Wilcox, 2000).

*Heterokontophyta*: esta división incluye varias clases: Xanthophyceae, Chrysophyceae, Synurophyceae, Dictyochophyceae, Pelagophyceae,

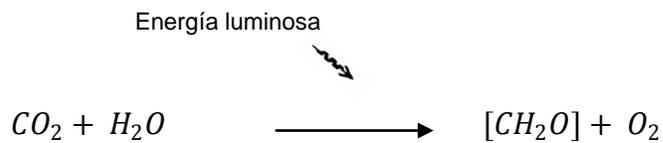
Raphidophyceae, Estigmatophyceae, Phaeophyceae, y Bacillariophyceae. Las microalgas pertenecientes a la clase Chrysophyceae son de agua dulce, contienen clorofilas *a* y *c*, pueden tener pirenoides y estigmas (manchas oculares). Son organismos unicelulares o pluricelulares que pueden formar colonias. Su principal característica es la presencia de cloroplastos con pigmentos de color amarillo que les confieren un aspecto dorado, sin embargo su coloración va de dorada a amarillo o verde. Son de morfología variable, pueden tener flagelos. La sustancia de reserva alimentaria es comúnmente el glucano  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) crisolaminarina, pero nunca almidón (Dawes, 1991; Lee, 1999; Graham y Wilcox, 2000).

### 1.2.2. Fotosíntesis (captura y fijación del $CO_2$ ).

Las plantas, algas y algunos microorganismos utilizan la luz solar, para obtener la energía necesaria en la síntesis de carbohidratos mediante un proceso que se denomina *fotosíntesis*, el cual además constituye la vía de captura y fijación del carbono y la fuente de oxígeno en la atmósfera. Existen dos tipos de fotosíntesis, una llamada oxigénica que es llevada a cabo por las plantas y algas, donde el agente reductor es el agua y otra anaeróbica que es realizada por bacterias, donde diversos compuestos orgánicos o inorgánicos actúan como donadores de electrones, según la especie.



En el proceso real de la fotosíntesis intervienen muchos pasos intermedios y la hexosa no es el principal hidrato de carbono obtenido, por lo tanto la reacción fotosintética anterior suele escribirse de forma general como sigue:



La energía luminosa no puede utilizarse directamente para impulsar esta reacción y el  $\text{H}_2\text{O}$  no reduce al  $\text{CO}_2$  directamente. El proceso global está compuesto por dos subprocesos en todos los organismos fotosintéticos: el primero está constituido por una serie de pasos denominados reacciones luminosas, donde se utiliza la energía de la luz solar para llevar a cabo la oxidación fotoquímica del  $\text{H}_2\text{O}$ , con esta oxidación se consigue primero que el agente oxidante  $\text{NADP}^+$  se reduzca a NADPH, produciendo equivalentes reductores y la liberación del  $\text{O}_2$ , y además que la energía luminosa se capture mediante la fotofosforilación. En el segundo subproceso llamado reacciones oscuras de la fotosíntesis, el NADPH y el ATP producidos por las reacciones luminosas se utilizan para la síntesis reductora de los carbohidratos a partir del  $\text{CO}_2$  y el agua (figura 2).

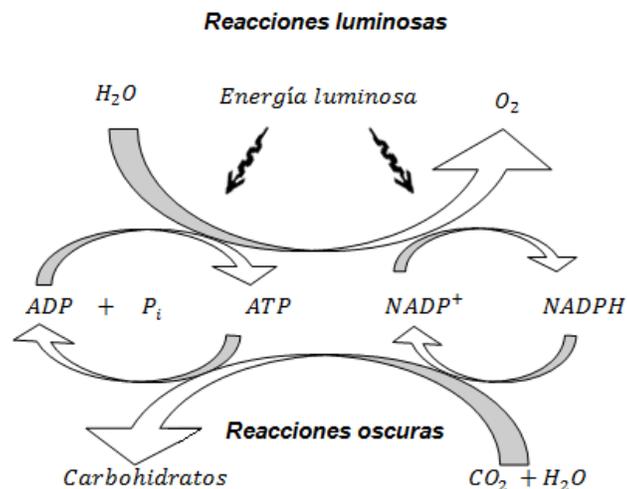


Figura 2. Reacciones luminosas y oscuras en la fotosíntesis, adaptado de Mathews y van Holde, 2005.

Debido a que aproximadamente el 50% de la biomasa microalgal está compuesta por carbono, este elemento es uno de los nutrientes más importantes para el crecimiento. Todas las microalgas utilizan el carbono inorgánico para sintetizar

---

componentes orgánicos. En ambientes acuosos el carbono se presenta en forma de dióxido de carbono acuoso ( $\text{CO}_2$  (aq)), ión bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) o ión carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) en función del pH y temperatura. La posibilidad de que las microalgas utilicen el carbono únicamente en forma de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  o  $\text{CO}_3^{2-}$ , no es un problema, porque las reacciones de interconversión entre las formas químicas son suficientemente rápidas, para que no sea un paso limitante en la demanda de  $\text{CO}_2$  para las células.



Estudios detallados, sobre la influencia de la fuente de carbono sobre la productividad de las microalgas, han mostrado que aunque el  $\text{HCO}_3^-$  es fácilmente asimilado por las células, es una fuente pobre de carbono si se compara con el  $\text{CO}_2$  (Carvalho *et al.*, 2006). El contenido de  $\text{CO}_2$  en el aire es de 0.03%- 0.04% v/v, por lo tanto la transferencia del carbono al medio de cultivo es pequeña, aún en presencia de una gran área de transferencia o incrementándose el mezclado. Por ello para el cultivo de microalgas es común utilizar corrientes gaseosas enriquecidas con  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono (Carvalho *et al.*, 2006). Cuando el  $\text{CO}_2$  es inyectado al cultivo, una parte es consumido por las células y el resto se pierde en la atmósfera. De acuerdo con la teoría de la doble película, la transferencia del  $\text{CO}_2$  de la fase gaseosa a las células ocurre a través de una secuencia de pasos (figura 3): transporte del seno del gas a la película del gas cercana a la interface, difusión a través de la película gaseosa, transporte a través de la interface gas-líquido, difusión en la película del líquido, transporte hasta el seno del líquido, difusión a través de la película líquida externa de la célula, transporte hasta la pared celular de las células y, por último, la absorción metabólica de las células (figura 3).

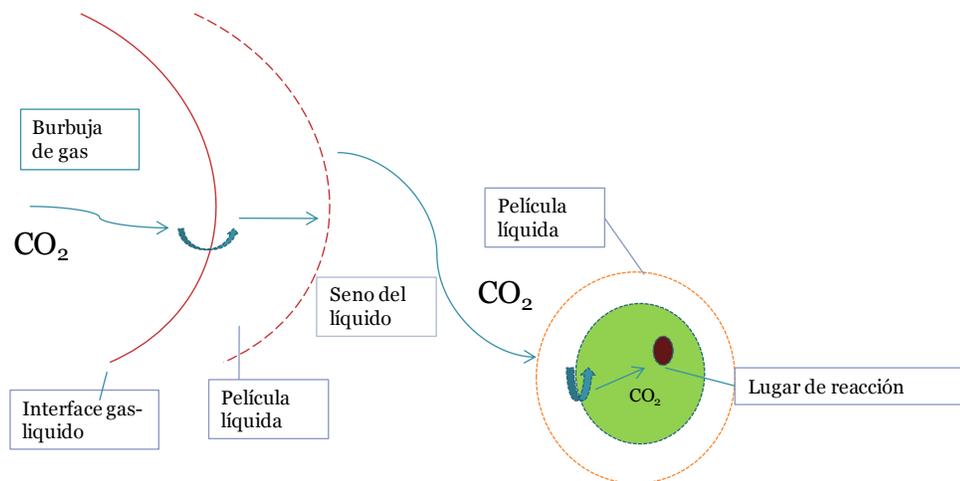


Figura 3. Transporte del  $\text{CO}_2$  desde el seno del gas hasta el interior de las células.

El  $\text{CO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$  son consumidos por las microalgas, el ión bicarbonato entra por transporte activo a la célula y el  $\text{CO}_2$  es probablemente hidratado en la membrana plasmática en un sitio activo cercano al del ion bicarbonato, y en el interior de la célula es transformado a  $\text{CO}_2$  por la Anhidrasa carbónica (figura 4a). El  $\text{CO}_2$  es inmediatamente incorporado al ciclo de Calvin por la enzima Rubisco, el ácido 3-fosfoglicérico (PGA) es obtenido como metabolito intermediario e incorporado en las distintas rutas metabólicas para la síntesis de macromoléculas como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

El ATP y el NADPH producidos por las reacciones luminosas de la fotosíntesis actúan en la síntesis de carbohidratos en el ciclo de Calvin, el cual tiene tres fases bien diferenciadas (figura 4b): 1) *Carboxilativa*, que corresponde a la incorporación de una molécula de  $\text{CO}_2$  a una de ribulosa-1,5-difosfato para formar un compuesto transitorio de seis átomos de carbono que se hidroliza rápidamente en dos moléculas de 3-fosfoglicerato (reacción catalizada por la Rubisco), 2) *Reductiva*, donde se reduce el grupo carboxilo del fosfoglicerato a aldehído utilizando el  $\text{H}^+$  donado por el NADPH y se obtiene gliceraldehído-3-fosfato, reacción que requiere de la energía del ATP, 3) *Regenerativa*, donde se recupera la molécula de ribulosa-1,5-difosfato aceptora del  $\text{CO}_2$ , por una serie de reacciones enzimáticas.

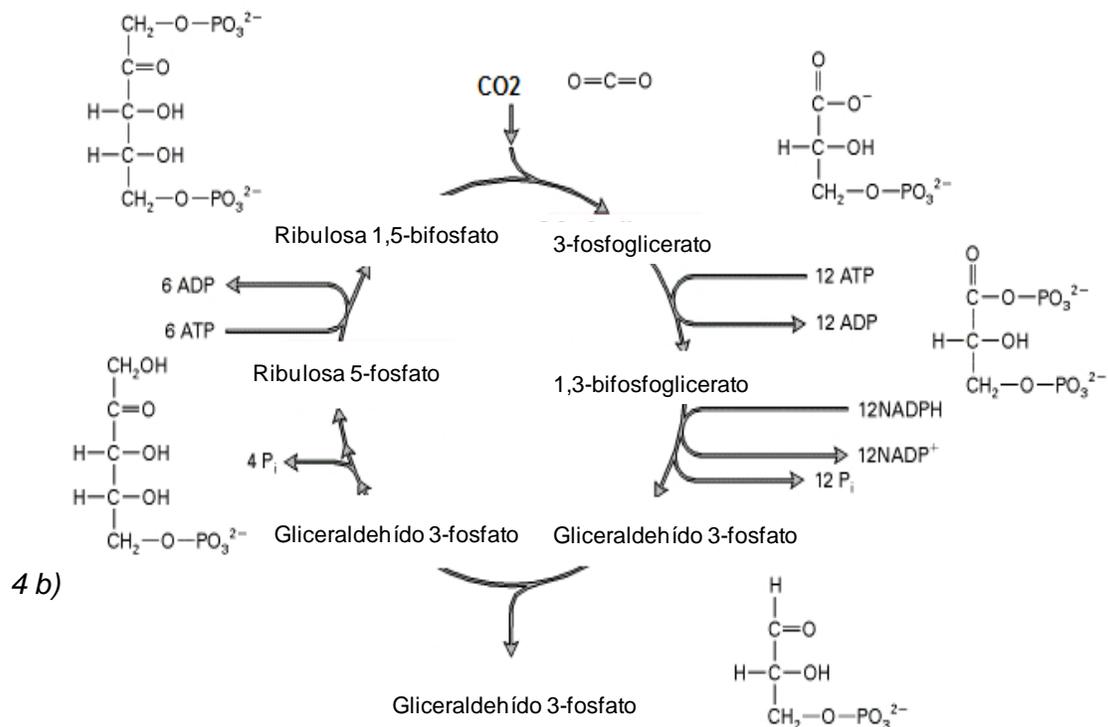
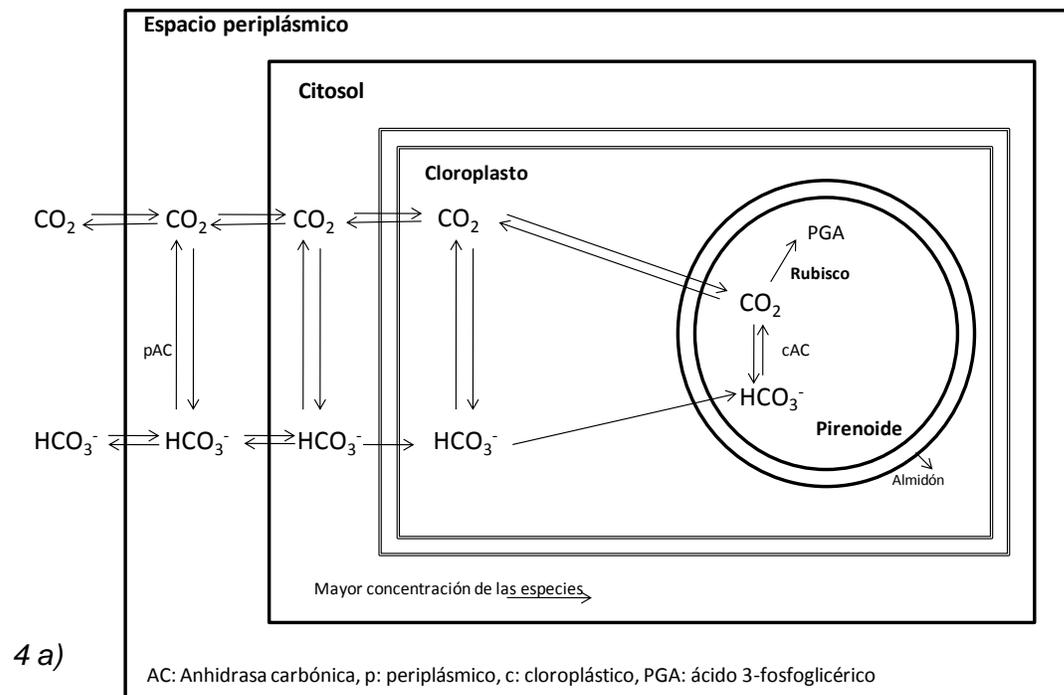


Figura 4. a) Transporte del  $\text{CO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$  al interior de las células, adaptado de Moroney y Somanchi, 1999. b) ciclo de Calvin, adaptado de Mathews y van Holde, 2005.

En el estroma de los cloroplastos, una serie de reacciones exergónicas convierten el PGA o gliceraldehído 3-fosfato (G3P) en fructosa 1,6 difosfato y por último en disacáridos o azúcares, algunas moléculas de G3P, son además convertidas en aminoácidos o grasas, componentes esenciales de las algas. La fijación de seis moléculas de CO<sub>2</sub> y la formación de tres moléculas G3P, requiere del consumo de 18 ATPs y 12 NADPHs generados en las reacciones luminosas de la fotosíntesis.

Las plantas, bacterias fotosintéticas y microalgas siguen la vía normal C<sub>5</sub> + C<sub>1</sub> = 2 C<sub>3</sub>, sin embargo también hay plantas como el maíz, la caña de azúcar y algunas microalgas que utilizan la ruta auxiliar C<sub>3</sub> + C<sub>1</sub> = C<sub>4</sub> (Ciclo de Hatch y Slack) en la que el CO<sub>2</sub> se incorpora al fosfoenol piruvato para dar oxalacetato, un compuesto de cuatro carbonos que se reduce a malato o aspartato.

### *1.2.3. Usos y aplicaciones de las microalgas.*

La variedad de metabolitos producidos por las microalgas es muy amplia y muchos tienen valor comercial. Las microalgas han comenzado a jugar un papel importante en la biotecnología. El primer uso de las microalgas por humanos data de hace 2000 años en China, donde utilizaban a la Cyanobacteria *Nostoc* sp. como alimento. Sin embargo, la biotecnología algal empezó a desarrollarse hasta la mitad del siglo pasado. Hoy en día, hay numerosas aplicaciones para las microalgas. Por ejemplo, 1) pueden ser utilizadas para incrementar el valor nutricional de los alimentos para humanos y animales, 2) juegan un papel crucial en la acuicultura 3) pueden ser incorporadas en los cosméticos y 4) industrialmente son cultivadas para la obtención moléculas de alto valor agregado, como: fármacos, ácidos grasos poliinsaturados (agregados a las fórmulas de alimentos infantiles y suplementos nutricionales) y pigmentos (utilizados como tintes naturales). También las microalgas pueden servir como materia prima para la obtención de diferentes tipos de biocombustibles renovables, esto incluye al metano producido por digestión anaeróbica de la biomasa algal, el biodiesel derivado del aceite de las microalgas y la producción fotobiológica

de biohidrógeno (Spolaore *et al.*, 2006). La idea de utilizar a las microalgas como fuente de combustible no es nueva, pero ha tomado importancia debido a los altos precios del petróleo y más significativamente a la emergente consternación respecto al calentamiento global.

La comercialización a gran escala de microalgas comenzó en los años 60's, en Japón con el cultivo de *Chlorella* spp. por Nihon Chlorella Co. (Taipei, Taiwan). En los 70's se cosechaba *Arthrospira maxima* Setchell *et* Gardner en el lago Texcoco por Sosa Texcoco S.A. (Ciudad de México, México). Para 1980, se contaba con 46 fábricas a gran escala en Asia, que producían poco más de una tonelada de microalgas por mes. La producción comercial de *Dunaliella salina* Teodoresco como fuente de  $\beta$ -caroteno, se convirtió en la tercera mejor industria algal en Australia en el año de 1986, por ese tiempo en India se producían a gran escala varias especies de Cyanobacteria. Más recientemente se han establecido muchas plantas productoras de *Haematococcus pluvialis* Flotow como fuente de astaxantinas en USA e India (Spolaore *et al.*, 2006).

Para el cultivo a gran escala las microalgas deben contar con diversas características que le confieren ventajas y desventajas en su cultivo (tabla 1).

Tabla 1. Características requeridas en las microalgas para su uso biotecnológico (Borowitzka, 1992).

Características	Ventajas	Desventajas
Crecimiento en condiciones extremas.	Reducción de problemas de competencia con otras especies o depredadores.	Número limitado de especies disponibles y algunos ambientes extremos son difíciles de mantener a gran escala.
Rápida tasa de crecimiento.	Provee de ventajas competitivas sobre otras especies y depredadores, además reduce el área de cultivo requerida.	La tasa de crecimiento es usualmente inversa al tamaño de las células.
Gran tamaño celular, morfología colonial o filamentosos.	Reduce el costo de la cosecha.	Las células grandes usualmente crecen lentamente.
Tolerancia a las variaciones de las condiciones ambientales.	Menos control de las condiciones de cultivo requeridas para un cultivo confiable.	----
Tolerancia a los esfuerzos de corte.	Permite utilizar métodos de bombeo y mezclado más baratos.	----
Alto contenido celular del producto.	Mayor valor de la biomasa.	Los productos generalmente son metabolitos secundarios y altas concentraciones ocurren con un crecimiento más lento.

### Nutrición y salud humana.

Actualmente podemos encontrar en el mercado a las microalgas en forma de tabletas, cápsulas y líquidos para nutrición humana, también pueden ser incorporadas en pastas, bocadillos y barras de dulces o incluso en goma de mascar. Debido a sus diversas propiedades químicas, pueden utilizarse como suplementos alimenticios o representar una fuente natural de colorante para alimentos. Las especies más dominantes en este mercado son: *Chlorella* spp., *Arthrospira* spp., *Dunaliella salina* y *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born et Flah.

Las especies de *Arthrospira*, son utilizadas por su alto contenido de proteínas y valor nutritivo, además estas microalgas tiene aplicación terapéutica, promoviendo: el alivio de la hiperlipidemia (aumento de la concentración de lípidos en la sangre), la disminución de la hipertensión, la protección contra daño renal y el crecimiento y promoción de los *Lactobacillus* intestinales. Las especies de *Chlorella* son

producidas por más de 70 compañías, la sustancia más importante es el  $\beta$ -1,3-glucan, el cual es un inmunoestabilizador activo, un radical libre que reduce los lípidos de la sangre; además se le han atribuido otros efectos terapéuticos por su eficacia en el tratamiento de las úlceras gástricas, la prevención contra la arteroesclerosis y por su acción antitumoral. *Dunaliella salina* es un alga verde flagelada usada en la producción industrial de  $\beta$ -caroteno, un componente esencial en la dieta de humanos y animales (Pulz y Gross, 2004; Spolaore *et al.*, 2006).

#### Nutrición animal.

Las microalgas pueden ser incorporadas en el alimento de una gran variedad de animales, desde peces (acuicultura) a mascotas y animales de granja. De hecho el 30 % de la producción es vendida para la alimentación de animales y un poco más del 50 % de la producción mundial de *Arthrospira* spp. es destinada a los suplementos alimenticios. La adición de microalgas al alimento para mascotas tiene efecto en la salud y en el aspecto físico de gatos, perros, conejos, peces y reptiles (Pulz y Gross, 2004; Spolaore *et al.*, 2006).

Para ser utilizadas en acuicultura las microalgas deben cumplir con ciertos criterios: 1) tienen que ser fácilmente cultivables, 2) no tóxicas, 3) de tamaño correcto para ser ingeridas, 4) de alto valor nutricional y 5) de pared celular digerible para hacer disponibles los nutrientes. El contenido de proteína es el mayor factor para determinar el valor nutricional de una microalga (Spolaore *et al.*, 2006). Una aplicación importante es su uso para refinar los productos de acuicultura, ya que las dietas artificiales de peces son pobres en pigmentos naturales, así se incorporan microalgas con alto contenido de pigmentos como la astaxantina, para que peces como el salmón tengan su coloración característica.

#### Pigmentos.

Además de la clorofila como principal pigmento fotosintético las microalgas contienen muchos pigmentos más, que por una parte mejoran la eficiencia fotosintética

(ficobiliproteínas) de plantas y por otra las protege contra la radiación solar excesiva (carotenos). Como se mencionó anteriormente el alga verde flagelada *Dunaliella salina* es el organismo más utilizado para la producción en masa del  $\beta$ -caroteno, pero existen otros pigmentos de gran interés comercial como son las ficobiliproteínas, obtenidas de las cianobacterias *Arthrospira* spp. y de la rhodophyta *Porphyridium* sp. El potencial primario de estas moléculas es como tinte natural, pero un número importante de investigadores han observado en sus propiedades terapéuticas una amplia gama de aplicaciones farmacéuticas, un ejemplo es su uso en los laboratorios de inmunología. (Spolaore *et al.*, 2006). Las ficobiliproteínas, ficocianinas y ficoeritrinas, son pigmentos únicos en las algas y algunos son utilizados en alimentos y cosméticos (Pulz y Gross, 2004).

#### Cosméticos.

Algunos extractos de las microalgas pueden ser encontrados en productos para la cara y piel, ya sea como cremas o productos refrescantes y regenerativos, además son utilizados para la fabricación de productos de protección solar y cuidado del cabello. Uno ejemplo de productos comerciales son los extractos ricos en proteínas de *Arthrospira* spp. que se utilizan para reparar los signos tempranos del envejecimiento y prevención de la aparición de estrías, también los extractos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck estimulan la síntesis de colágeno en la piel y promueven la regeneración celular (Spolaore *et al.*, 2006).

#### Biomonitores.

Un bioensayo es un procedimiento que usa organismos evaluando su respuesta para estimar el efecto de agentes físicos o químicos en el medio ambiente. Los biomonitores proveen de una advertencia temprana de posibles deterioros ambientales, y pueden además proveer mediciones sensitivas de los contaminantes. Uno de los usos de los cultivos de algas es como biomonitores, para la detección en efluentes naturales de nutrientes o sustancias que son tóxicas para las algas. Aunque en algunos casos se utilizan peces como biomonitores primarios en

ecosistemas acuáticos, las algas son mucho más sensitivas que los animales a algunos contaminantes incluidos los detergentes, efluentes de la manufacturación de textiles (fenoles), tintes y especialmente herbicidas (Graham y Wilcox, 2000).

*Producción de biodiesel a partir de aceites de microalgas.*

Las microalgas pueden ser una fuente potencial de materia prima en la producción del biodiesel, ya que a diferencia de otros cultivos para la obtención de aceites las microalgas crecen de manera rápida y muchas son ricas en aceites (tabla 2), por lo que se obtienen mayores rendimientos por unidad de área de cultivo (Chisti, 2007).

Tabla 2. Comparación de rendimiento para la producción de aceite a partir de diferentes fuentes (Chisti, 2007).

<b>Cultivo</b>	<b>Rendimiento de aceite (L Km<sup>-2</sup>)</b>	<b>Área necesaria para el cultivo (Km<sup>2</sup>)</b>
Maíz	17,200	15,400
Soya	44,600	5,940
Aceite de palma	595,000	450
Microalgas <sup>(a)</sup>	5,870,000	45
Microalgas <sup>(b)</sup>	13,690,000	20

a) Con el 30% de aceites en peso de biomasa.

b) Con el 70% de aceites en peso de biomasa.

El contenido de aceites en las microalgas comúnmente está entre 20-50%(P/P). La productividad lipídica, que es la masa de aceite producida por unidad de volumen del caldo de cultivo por día, depende de la tasa de crecimiento del alga y del contenido de aceites en la biomasa. El potencial de utilizar a las microalgas en la producción de biodiesel, se basa en que no compromete la producción de alimentos, forraje y otros productos derivados de las cosechas, aunque generalmente es más costoso (Chisti, 2007).

La producción de biodiesel a partir de aceites de microalgas aún no es económicamente factible. Las microalgas deseadas para la producción de biodiesel, deben tener una alta productividad lipídica, por ello se han llevado a cabo diversos

estudios para incrementar el contenido de aceites. Una de las estrategias ampliamente estudiadas en distintas especies de microalgas es la limitación de nitrógeno durante el crecimiento (Khozin-Goldberg, 2002; Spolaore *et al.*, 2006; Solovchenko *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008), lo cual resulta eficiente en el incremento del contenido de aceites intracelulares, pero disminuye la concentración celular, por lo que aún faltan estudios para solucionar este problema.

#### Aplicaciones ambientales.

Los gobiernos y compañías energéticas de todo el mundo han mostrado interés en la fijación biológica del CO<sub>2</sub>. Por ejemplo investigadores en Noruega, Japón, Italia y Estados Unidos se esfuerzan por encontrar un proceso económicamente factible, para la aplicación de microalgas en la protección del medio ambiente. En Alemania desarrollaron un proyecto para utilizar el efluente gaseoso y el agua condensada de una industria para producir biomasa microalgal. Este proceso fue escalado a un fotobiorreactor de 6 m<sup>3</sup> y mostró ser viable, aunque no económicamente atractivo (Pulz y Gross, 2004).

### **1.3. Sistemas de cultivo de microalgas.**

Los sistemas para producción de microorganismos fototróficos son llamados fotobiorreactores, estos sistemas se evalúan en términos de su configuración, productividad y viabilidad económica. La más importante y obvia diferencia en los sistemas de producción de microalgas es la exposición del cultivo al ambiente, por ello se clasifican en dos diseños básicos. Los sistemas abiertos, en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera y los sistemas cerrados, en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera. Los sistemas abiertos pueden dividirse en aguas naturales (lagos, lagunas y estanques) y lagunas artificiales o contenedores diseñados en distintas formas, los cuales son mucho más simples que los sistemas cerrados. Los sistemas cerrados consisten en fotobiorreactores en diversas formas,

tamaños, longitudes y materiales de construcción, los cuales permiten el mejor control del cultivo. En todos los casos el crecimiento óptimo es el objetivo biotecnológico, para lo cual la clave del éxito son factores como la luz, nutrientes y turbulencia (Pulz, 2001).

Los sistemas abiertos son los más parecidos al ambiente natural de las microalgas y han sido utilizados en gran medida para la obtención de metabolitos y para el tratamiento de aguas residuales (Pulz, 2001). Existen cuatro diseños: Estanques poco profundos, tanques, estanques circulares y estanques tipo carrusel, estos últimos están constituidos por canales en forma de circuito cerrado poco profundos entre 10 y 30 cm y de 2 a 3 m de ancho (figura 5). Para proveer de un adecuado mezclado en estos sistemas el medio de cultivo es impulsado mediante paletas rotatorias (figura 5) (Borowitzka, 1999; Contreras *et al.*, 2003; Ugwu *et al.*, 2008). Una de las mayores ventajas de estos sistemas es que son fáciles de construir y operar, sin embargo tienen como limitantes, la baja iluminación, la evaporación, la difusión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera y la necesidad de grandes áreas de cultivo. Además, debido al ineficiente mezclado que se logra en estos sistemas, la tasa de transferencia de masa es baja, lo que resulta en una baja productividad de biomasa. Otro factor a considerar es la contaminación por depredadores y otros heterótrofos que reducen la producción comercial de algas en sistemas abiertos, a únicamente microalgas que crezcan bajo condiciones extremas (Ugwu *et al.*, 2008).

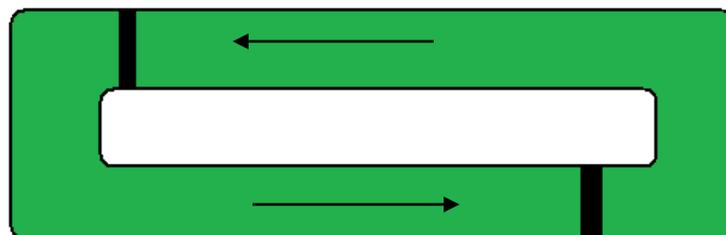


Figura 5. Fotobiorreactor tipo carrusel, los bloques negros indican paletas, adaptado de Contreras *et al.*, 2003.

Para superar los problemas con los sistemas de cultivo abiertos se han realizado diversas investigaciones sobre el cultivo de microalgas en sistemas cerrados, lo que ha llevado al desarrollo de una amplia variedad de diseños y a un incremento significativo de la productividad microalgal.

Los sistemas cerrados tienen ventajas como, 1) facilidad para cosechar la biomasa, 2) mantenimiento del cultivo sin contaminación, 3) mejor control de las condiciones de cultivo y 4) menor inversión de capital en el fotobiorreactor. Este último factor es un elemento importante en el costo de producción de productos derivados de microalgas (Contreras *et al.*, 2003). Además, la obtención de productos de valor agregado con aplicaciones farmacéuticas y cosméticas sólo es viable en sistemas cerrados, ya que son necesarias condiciones reproducibles de producción y buenas prácticas de manufactura.

Los fotobiorreactores cerrados utilizados en el cultivo de microalgas generalmente tienen configuración tubular (fabricados principalmente de vidrio, plástico o bolsas de plástico) o aplanada (tipo placa aplanada). Los arreglos verticales u horizontales tubulares o de placas son los preferidos, ya que proveen mejor distribución de la iluminación y el flujo (Pulz, 2001).

### *1.3.1. Características de los fotobiorreactores.*

Durante el cultivo de microalgas puede haber muchos factores que afecten su crecimiento, como la disponibilidad de los nutrientes, el oxígeno disuelto, esfuerzos de corte, pH, temperatura, etc., cuando ninguno de ellos es limitante, la disponibilidad de luz determina la velocidad con la que se realiza la fotosíntesis y como consecuencia la velocidad de crecimiento. La cantidad de luz disponible para las células depende de la configuración del reactor. También en los fotobiorreactores, la penetración de la luz decrece en función del incremento de la densidad celular,

generando una zona eufótica y otra oscura (figura 6), por tanto las microalgas están expuestas a periodos cíclicos de luz y oscuridad (fotoperiodo). La frecuencia y duración de estos ciclos están determinadas por el suministro de luz, la configuración del reactor y la intensidad del mezclado. Esto impacta en la cantidad de luz recibida por cada célula y ayuda a prevenir la inhibición del aparato fotosintético en presencia de una alta irradiancia, por ello los ciclos de luz y oscuridad son necesarios para lograr una alta eficiencia en la utilización de la luz.

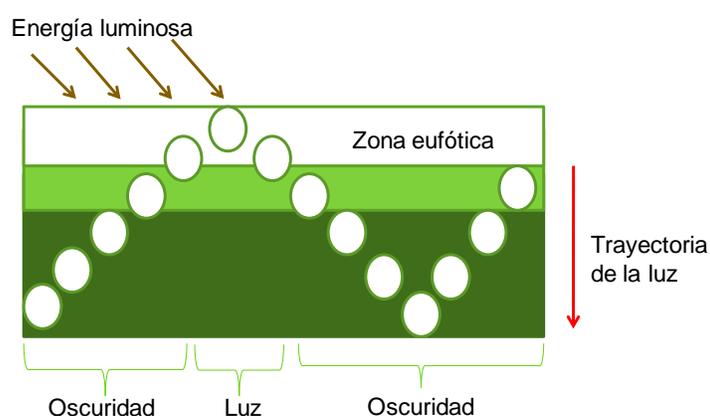


Figura 6. Distribución de la luz en un fotobiorreactor, adaptado de Contreras *et al.*, 2003.

Los cultivos de microalgas en general pueden ser iluminados con luz solar, luz artificial o ambas. Los sistemas con gran superficie de iluminación incluyen los estanques poco profundos, reactores tubulares horizontales, reactores de serpentín y reactores tubulares inclinados. Generalmente a escala de laboratorio los fotobiorreactores son iluminados artificialmente, ya sea interna o externamente usando lámparas fluorescentes, algunos de estos fotobiorreactores son: tubulares (reactores helicoidales y cónicos), columnas verticales (columnas de burbujas, airlift) y tanques agitados.

### Fotobiorreactores tubulares.

Los fotobiorreactores tubulares son unos de los más adecuados para ser operados en el exterior. Son construidos con tubos de plástico o vidrio y el medio de cultivo es recirculado, pueden tener forma horizontal o de serpentín, vertical, cónica o inclinada. El sistema de aireación y mezclado se hace por lo regular mediante el bombeo de aire. Las ventajas y limitaciones de este tipo de reactor se muestran en la tabla 3. La fotoinhibición es muy común en fotobiorreactores instalados en el exterior, la cual puede ser contrarrestada con un buen sistema de mezclado. La adherencia de las células a las paredes resulta en un problema significativo, ya que reduce el área de exposición a la luz (Ugwu *et al.*, 2008). En la figura 7 se muestran esquemas de fotobiorreactores tubulares de serpentín y cónico. Los cuales son fabricados con tubos de polietileno enrollados de forma circular junto a una torre de intercambio de gases y un sistema de calentamiento, en donde una bomba impulsa el medio de cultivo a lo largo de los tubos (Carvalho *et al.*, 2006).

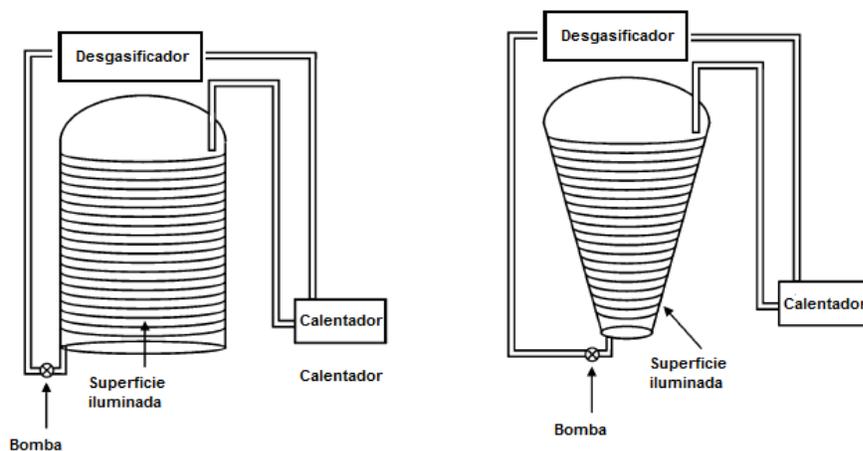


Figura 7. Representación de fotobiorreactores tubulares tipo serpentín (izquierda) y cónicos (derecha), adaptado de Carvalho *et al.*, 2006.

### Fotobiorreactores de placa aplanada.

Este tipo de fotobiorreactores ha recibido mucha atención en la actualidad debido a su gran superficie de iluminación, lograda por la trayectoria de luz tan corta dentro

del reactor. Los materiales usados en la construcción de las placas son usualmente materiales transparentes como el PVC, para maximizar la utilización de la energía luminosa. La acumulación de oxígeno disuelto en las placas es muy baja en comparación con los fotobiorreactores tubulares, además se ha reportado que la eficiencia fotosintética lograda es muy alta, por tanto son una buena opción para el cultivo en masa de microalgas (Ugwu *et al.*, 2008). Sin embargo las dimensiones de estos reactores pueden afectar la transferencia de masa en el cultivo de microalgas que son alimentados con CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono, lo cual conlleva a una disminución de la tasa fotosintética (Zhang *et al.*, 2002).

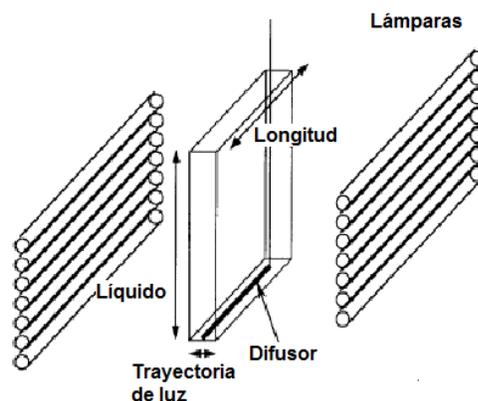


Figura 8. Representación de un fotobiorreactor de placa aplanada, adaptado de Zhang *et al.*, 2002.

### Tanques agitados.

En los tanques agitados la mezcla y dispersión de las burbujas se realiza mediante agitación mecánica, lo cual requiere de una relativa cantidad de energía por unidad de volumen (Doran, 1998). El mezclado favorece el intercambio del CO<sub>2</sub> gaseoso al líquido, evita la sedimentación celular, la formación de gradientes de concentración de nutrientes y principalmente permite que todas las células accedan a las zonas iluminadas en un fotobiorreactor. Sin embargo la proporción de área/volumen es muy baja, y por lo tanto la disponibilidad de luz es menor, lo que se traduce en una baja eficiencia fotosintética. Para superar este problema se han desarrollado sistemas con iluminación interna (figura 9) que pueden proveer una mejor distribución de la luz.

Estos sistemas pueden ser operados en lote, semicontinuo o en continuo, ya que los parámetros de operación son fácilmente controlables. Además se puede lograr un cultivo axénico por grandes periodos, lo cual es crucial para la producción de ciertos metabolitos de valor agregado (Carvalho *et al.*, 2006). Por otro lado pueden ser modificados para utilizar energía solar y luz artificial, en este caso la fuente de luz artificial es encendida cuando la intensidad de la energía solar disminuye. Estos fotobiorreactores están equipados con un impulsor para la agitación del cultivo. El aire y el CO<sub>2</sub> son suministrados en el fondo por medio de difusores (Ugwu *et al.*, 2008).

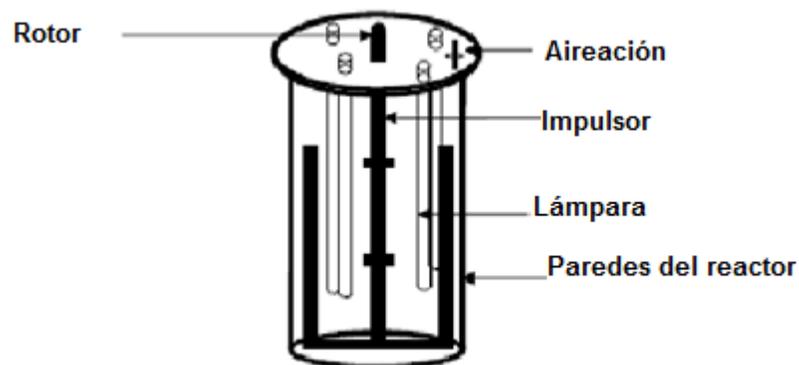


Figura 9. Diagrama de un fotobiorreactor con iluminación interna, adaptado de Ugwu *et al.*, 2008.

### Columnas verticales.

Muchos diseños y escalas de los fotobiorreactores de columna vertical han sido probados para el cultivo de microalgas. Este tipo de arreglo es compacto, de bajo costo y fácil de operar en cultivos unialgales. Además son un diseño prometedor para el cultivo a gran escala de microalgas (Ugwu *et al.*, 2008). Los reactores airlift y columnas de burbujeo son ejemplos de este tipo de fotobiorreactores, usualmente son fabricados de polietileno o vidrio, materiales suficientemente transparentes que permiten una buena penetración de la luz. El aire es burbujeado desde el fondo, lo cual provee de un buen suministro de CO<sub>2</sub> y una eficiente remoción del O<sub>2</sub> (Carvalho *et al.*, 2006). Cuando las columnas verticales son instaladas en el exterior, pueden

ser colocadas en estructuras móviles metálicas que permitan el mejor aprovechamiento de la energía solar. Existen reportes de que las columnas de burbujas y los reactores airlift, con diámetros menores a 0.19 m, permiten una concentración de biomasa y tasas de crecimiento que son comparables con los valores típicos de los fotobiorreactores tubulares. Por ejemplo, para la microalga *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin cultivada en un airlift, las tasas de crecimiento específico máximas alcanzadas son  $0.08 \text{ h}^{-1}$  y en un fotobiorreactor tubular son de  $0.06\text{-}0.09 \text{ h}^{-1}$  (Sánchez *et al.*, 2002). A continuación en la tabla 3 se comparan de manera general las ventajas y desventajas del cultivo de microalgas en los fotobiorreactores más utilizados.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los sistemas de cultivo de microalgas (Ugwu *et al.*, 2008).

Sistema de cultivo	Ventajas	Desventajas
<i>Sistema abierto.</i> Estanques.	Económicos, fáciles de limpiar después del cultivo, buenos para cultivo masivo de algas.	Poco control de condiciones de cultivos, dificultad en el crecimiento por largos periodos de tiempo, baja productividad, grandes áreas de cultivo, limitado a ciertas especies, fácil contaminación.
<i>Sistema cerrado.</i> Columna vertical.	Alta transferencia de masa, buen mezclado, bajo esfuerzo de corte, bajo consumo de energía, fácil de escalar, reduce la fotoinhibición.	Poca superficie de iluminación, uso de materiales sofisticados, disminución de la superficie iluminada al ser escalados.
Placa aplanada.	Grandes superficies iluminadas, adecuado para cultivos en el exterior, bueno para inmovilización de algas, buena penetración de la luz, alta productividad, relativamente baratos, fáciles de limpiar.	El escalamiento requiere muchos materiales de soporte, difícil controlar la temperatura, crecimiento sobre las paredes, estrés hidrodinámico en algunas cepas.
Tubulares.	Grandes áreas de iluminación, adecuado para cultivos en el exterior, bastante productividad de biomasa, relativamente baratos.	Gradientes de pH, oxígeno disuelto a lo largo de los tubos, crecimiento de algas en las paredes, requiere de un gran espacio de cultivo.

El mezclado es un parámetro de diseño de los fotobiorreactores muy importante. Un buen mezclado asegura: la obtención una alta concentración celular, el numero de algas en suspensión y la eliminación de la estratificación térmica (que impide los intercambios gaseosos entre la superficie y el fondo). Además ayuda a la distribución de los nutrientes, promueve el intercambio gaseoso, reduce el grado de sombreado y disminuye la probabilidad de fotoinhibición. Al incrementar la tasa de aireación se mejora: el mezclado, la circulación del líquido y la transferencia de masa entre el gas y el líquido en los cultivos algales. Sin embargo, las burbujas pueden unirse durante el flujo para formar una interface entre el medio de cultivo, el gas y las paredes del tubo, por lo tanto el área de contacto entre el líquido y el gas se reduce, lo que resulta en una disminución de la tasa de transferencia de masa.

La velocidad y tamaño de las burbujas de aire dependen del flujo del líquido dentro del reactor. Al incrementar el caudal del gas, el diámetro de las burbujas incrementa, lo que consecuentemente aumentará la velocidad de las burbujas. Algunos estudios en microalgas han demostrado la relación entre la velocidad superficial del gas y el coeficiente global de transferencia de masa ( $K_L a$ ) (Ugwu *et al.*, 2008). Otro aspecto hidrodinámico importante que ha sido utilizado para caracterizar el diseño de los fotobiorreactores es el *gas holdup*. El gas holdup es la fracción del volumen del reactor tomada por el gas, puede ser estimada como el volumen del líquido desplazado por el gas debido a la aireación. Este parámetro es muy importante porque determina la tasa de circulación, el tiempo de residencia del gas, así como el coeficiente de transferencia de masa (Ugwu *et al.*, 2008).

### 1.3.2. Fotobiorreactores utilizados en la fijación de $CO_2$ .

Los sistemas que se alimentan con aire comprimido, como las columnas verticales burbujeadas o *airlift*, se utilizan con frecuencia por su sencillez y por que inducen un

esfuerzo de corte pequeño que no causa daño mecánico a las células (Sánchez *et al.*, 2000).

### Columna de burbujas.

En los reactores de columna de burbujas, la aireación y la mezcla se alcanza mediante la inyección del gas, lo cual requiere de menor energía que la agitación mecánica. Las columnas son estructuras muy sencillas (figura 10), consisten generalmente en un recipiente cilíndrico y, a parte del difusor del aire comprimido no presentan estructuras internas. Las ventajas de estos reactores incluyen los bajos costos de producción, la ausencia de partes móviles y la adecuada transferencia de materia y calor. La hidrodinámica y transmisión de calor dependen por completo del comportamiento de las burbujas formadas por el difusor. Los regímenes de flujo dependen del caudal del gas, del diseño del difusor, diámetro de la columna y de las propiedades del medio de cultivo, como la viscosidad. En los reactores de columna es difícil predecir con exactitud el tamaño de las burbujas y las corrientes de circulación del líquido, y por tanto para calcular el coeficiente de transferencia de materia, se puede aproximar con la correlación  $K_L a = 0.32 U_G^{0.7}$  para medios no viscosos en flujos heterogéneos, donde  $K_L a$  es el coeficiente de transferencia de materia combinado y  $U_G$  la velocidad superficial del gas. Esta ecuación es válida para burbujas con un diámetro medio aproximado de 6 mm, diámetro de la columna entre 0.08 m y 11.6 m, altura de 0.3 m a 21 m y velocidad superficial de 0 a 0.3 m s<sup>-1</sup>. (Doran, 1998)

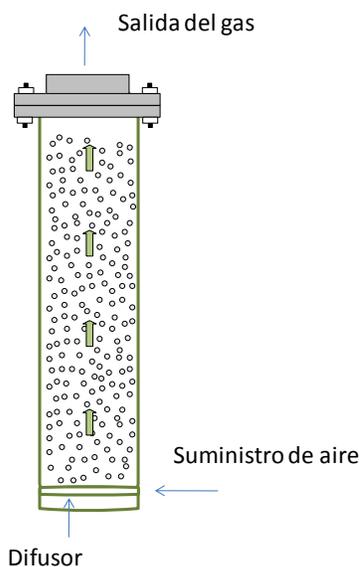


Figura 10. Fotobiorreactores de columna de burbujas, adaptado de Doran, 1998.

### Airlift.

En los reactores tipo airlift al igual que en las columnas de burbujas la mezcla se produce sin agitación mecánica. Existen varios tipos de reactores airlift, el rasgo característico que los diferencia de las columnas de burbujas es que, las corrientes de flujo del líquido están más definidas, debido a la separación física de las corrientes ascendentes y descendentes. El gas es inyectado en la parte del reactor llamada *riser*, el gas dentro del reactor y la disminución de la densidad producen un movimiento ascendente del líquido en el *riser*. El gas es expulsado en la parte superior del reactor y el líquido libre de burbujas se recircula a través del *downcomer*. En la figura 11 se muestran las configuraciones más comunes de los reactores airlift, en los reactores de bucle interno (izquierda y centro) el *riser* y *downcomer* se encuentran separados por un deflector interno o tubo concéntrico, los reactores de bucle externo (derecha) el *riser* y *downcomer* se encuentran separados por secciones horizontales en la parte superior e inferior. El rendimiento de estos reactores está influenciado por los detalles de construcción, por ejemplo la distancia entre la parte inferior del tubo interior a la base del reactor modifica, la diferencia de

presión en esta región y afecta la velocidad del líquido y el contenido de gas existente en el tubo (Doran, 1998).

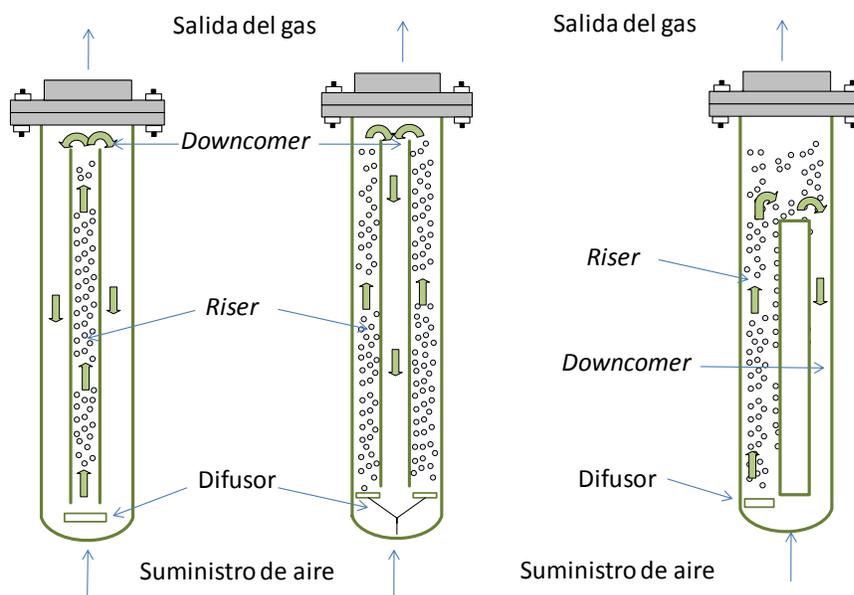


Figura 11. Fotobiorreactores airlift, adaptado de Doran, 1998.

Los reactores airlift generalmente proporcionan mejores mezclas que los de columna de burbujas excepto cuando se operan a velocidades bajas de líquido. Se ha comprobado que tanto el contenido de gas en el tubo como las velocidades de transferencia de materia gas-líquido, son similares en los reactores airlift con bucle interno y en los de columna de burbujas (Doran, 1998). Datos experimentales en el cultivo de microalgas sugieren que en un fotobiorreactor tubular como los diseños de columna de burbujas y airlift no se puede exceder de un diámetro de 0.2 m, ya que esto reduce significativamente la disponibilidad de luz (Sánchez *et al.*, 2000).

Muchos tipos de fotobiorreactores pueden ser utilizados para la obtención de diferentes productos de microalgas, sin embargo aunque estos reactores sean fácilmente operables a nivel laboratorio, solo algunos de ellos son exitosamente escalados a nivel piloto. El escalamiento puede realizarse incrementando la longitud, diámetro, altura o el número de compartimentos de los sistemas de cultivo

(dependiendo del tipo de fotobiorreactor). Sin embargo solo se han escalado algunos reactores con una buena productividad, en la tabla 4 se muestran los reportes de productividad de algunos reactores airlift y de columna de burbujas escalados en el exterior.

Tabla 4. Fotobiorreactores utilizados el cultivo de microalgas, adaptado de Ugwu *et al.*, 2008.

<b>Fotobiorreactores tubulares</b>	<b>Volumen (L)</b>	<b>Microalga</b>	<b>Productividad de biomasa (g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referencia</b>
Airlift.	200	<i>Porphyridium cruentum</i> Nägeli.	1.5	Camacho <i>et al.</i> , 1999.
Airlift.	200	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> Bohlin.	1.2	Acién <i>et al.</i> , 2001.
Airlift.	200	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> Bohlin.	1.9	Molina <i>et al.</i> , 2001.
Columna de burbujas.	55	<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow.	0.06	García-Malea <i>et al.</i> , 2006.

## CAPITULO 2. ANTECEDENTES DIRECTOS.

Se han investigado varias estrategias para reducir las emisiones de CO<sub>2</sub>, las cuales pueden clasificarse en dos categorías, reacciones químicas y reducción biológica del CO<sub>2</sub>. Actualmente la reducción biológica ha tenido mucho interés porque permite la producción de energía de biomasa aunado al proceso de fijación de CO<sub>2</sub>, (Wang *et al.*, 2008) este proceso puede llevarse a cabo por plantas y microorganismos fotosintéticos, sin embargo se estima que la captura de CO<sub>2</sub> por agricultura de plantas contribuye sólo en un 3-6 % de las emisiones de los combustibles fósiles (Skjanes *et al.*, 2007). Por otro lado, las microalgas son un grupo de organismos fotosintéticos procariontes (Cyanobacteria) o eucariontes (el resto de las divisiones) de rápido crecimiento, que tienen la habilidad de fijar CO<sub>2</sub> capturando la energía solar con una eficiencia de 10 a 50 veces mayor que las plantas terrestres (Li *et al.*, 2008b). La estrategia de utilizar microalgas para la reducción de CO<sub>2</sub> ofrece ciertas ventajas: 1) tienen altas tasas de crecimiento y habilidad para fijar CO<sub>2</sub> en comparación con las plantas forestales, agrícolas y acuáticas (Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008b), 2) permiten reciclar el CO<sub>2</sub> ya que el dióxido de carbono es convertido en energía química vía fotosíntesis, lo cual puede ser convertido en combustibles utilizando tecnologías existentes y 3) la mitigación del CO<sub>2</sub> por reacción química requiere de energía y costos de proceso, y el único incentivo económico son los créditos de CO<sub>2</sub> que se generan en el marco del Protocolo de Kyoto. Por otra parte, la mitigación biológica de CO<sub>2</sub> utilizando microalgas, podría ser rentable al combinarse con la producción de biocombustibles, tratamiento de aguas residuales o la obtención de productos de alto valor agregado (Wang *et al.*, 2008).

Las microalgas pueden fijar CO<sub>2</sub> de diferentes fuentes: 1) CO<sub>2</sub> contenido en la atmósfera, 2) CO<sub>2</sub> de los gases de combustión industrial y 3) CO<sub>2</sub> en forma de carbonatos. Diversos factores como la intensidad de luz y la concentración de CO<sub>2</sub> en el gas de entrada, pueden ser factores limitantes que influyan en la fotosíntesis de

las algas y por lo tanto inhiban la eficiencia de remoción del CO<sub>2</sub> (Cheng *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). El CO<sub>2</sub> puede ser un factor limitante en el crecimiento de diferentes variedades de microorganismos fotosintéticos, esto se ha comprobado en estudios, donde se observó, que la tasa de crecimiento de la diatomea *Chaetoceros wighamii* Brightwell y la microalga *Tetraselmis* sp. se incrementó cuando se suministra CO<sub>2</sub> al medio de crecimiento (de Morais y Costa, 2007a).

Comúnmente el cultivo de microalgas se realiza en tanques abiertos utilizando luz natural o artificial (Molina *et al.*, 2003), este método presenta ciertas desventajas: difícil control de las condiciones de cultivo, evaporación del medio, grandes áreas de cultivo y disminución de la incidencia de luz cuando se incrementa la profundidad. Una alternativa a estos problemas, es el uso de los fotobiorreactores tubulares, ya que permiten el cultivo en un sistema cerrado, previenen la contaminación y facilitan el control de las variables de proceso, con la desventaja de mayores costos de producción (Chisti, 2007). Los reactores ALR y BCR son ejemplos de fotobiorreactores verticales tubulares (VTP) que se fabrican regularmente de polietileno o vidrio, por lo que permiten una buena penetración de la luz, a su vez el aire, que es bombeado desde el fondo del reactor, provee un buen mezclado, suficiente suministro de CO<sub>2</sub> y eficiente remoción del oxígeno (Carvalho *et al.*, 2006).

de Morais y Costa (2007c) aislaron poblaciones de las microalgas *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing y *Chlorella kessleri* Fott *et* Nováková de una laguna de aguas residuales tratadas proveniente de la termoeléctrica Presidente Médicci (Brasil) y encontraron que toleraban altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, por otro lado la microalga *Scenedesmus obliquus* y la cianobacteria *Spirulina* sp. fueron cultivadas en VTP para fijar CO<sub>2</sub> con una concentración de 12 %, que corresponde a lo obtenido en la quema de combustibles fósiles. Los VTP, reducen el área de cultivo distribuyendo los organismos fotosintéticos verticalmente, además incrementan el tiempo de residencia del CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo y por consecuencia la eficiencia en la asimilación del CO<sub>2</sub> (de Morais y Costa, 2007a, 2007b).

En la tabla siguiente se resume la información de algunas especies de algas en las que se ha estudiado la fijación de CO<sub>2</sub>, algunas de las cuales pueden tolerar además de las altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, altas temperaturas, lo que las selecciona como candidatas para crecer con corrientes gaseosas generadas en las industrias termoeléctricas.

Tabla 5. Microalgas utilizadas en la fijación de CO<sub>2</sub>, adaptado de Wang *et al.*, 2008.

Microalga	%CO <sub>2</sub>	T (°C)	P <sub>CO<sub>2</sub></sub> (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
<i>Chlorella kessleri</i> Fott <i>et Nováková</i> .	18	30	0.163*
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck.	aire	25	0.075*
<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow.	16-34	20	0.143
<i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kützing.	18	30	0.26
<i>Spirulina</i> sp.	12	30	0.413*
<i>Dunaliella</i> sp.	3	27	0.313

El término P<sub>CO<sub>2</sub></sub> indica la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> con respecto a la productividad de biomasa.

\*Calculado a partir de la productividad de biomasa (P) de acuerdo a la ecuación

$P_{CO_2} = C_c * \left( \frac{M_{CO_2}}{M_C} \right) (P) = 1.88 * (P)$ , donde M<sub>CO<sub>2</sub></sub> es el peso molecular del CO<sub>2</sub>, M<sub>C</sub> es el peso molecular del carbono y el contenido de carbono en las células (C<sub>c</sub>) es derivado de la fórmula molecular C<sub>0.48</sub>H<sub>1.83</sub>N<sub>0.11</sub>P<sub>0.01</sub> (Chisti, 2007).

Dentro del grupo de investigación de la UAM-I y UAM-C, se llevó a cabo un estudio, sobre las estrategias operacionales para la remoción del CO<sub>2</sub> con la Cyanobacteria *Aphanothece microscopica* Nägeli. El cultivo se realizó en dos tipos de fotobiorreactores: reactor airlift (ALR) y reactor de columna de burbujas (BCR), operando con una corriente gaseosa al 15% de CO<sub>2</sub> v/v, donde se obtuvieron capacidades de eliminación de CO<sub>2</sub> máximas de 66.8 Kg m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup> para el ALR y de 64.1 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para el BCR, en operación simple (Jacob-Lopes *et al.*, 2009a).

## **CAPITULO 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.**

### **3.1. Justificación.**

Actualmente a nivel mundial se han intensificado las emisiones de los gases de efecto invernadero, en particular el CO<sub>2</sub>, con la agravante de que la deforestación ha limitado la capacidad regenerativa de la atmósfera para eliminar el CO<sub>2</sub>. Una alternativa para disminuir el CO<sub>2</sub> atmosférico es su captura a través del uso de microalgas. Las microalgas utilizan el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y en algunos casos también para la síntesis de diversos componentes de interés biotecnológico como son: pigmentos accesorios, fármacos, proteínas y lípidos. Estudios previos sobre el cultivo de microalgas en fotobiorreactores para la captura del CO<sub>2</sub>, han demostrado que la intensidad de luz y concentración de CO<sub>2</sub>, son factores limitantes en la fotosíntesis y que por tanto pueden inhibir el crecimiento y la captura del CO<sub>2</sub>.

El núcleo de la estrategia para la eficiente captura de CO<sub>2</sub> con microalgas en fotobiorreactores está en el modo de operación, configuración y la concentración de CO<sub>2</sub> suministrada, sin embargo esto depende principalmente de la especie de microalga, por ello los resultados no son fácilmente comparables, y por lo tanto el estudio de los factores que favorecen la captura de CO<sub>2</sub>, usando una comunidad de microalgas obtenidas de un ecosistema natural mexicano, como es el caso de Cuatro Ciénegas, Coahuila, representa una alternativa para generar nuevos conocimientos, sobre el cultivo de microalgas en fotobiorreactores y su utilización para desarrollar e implantar nuevas tecnologías, para la captura de CO<sub>2</sub> y producción de biomasa.

### **3.2. Objetivo general.**

Caracterizar la captura de CO<sub>2</sub> y el crecimiento en un fotobiorreactor, de una comunidad de microalgas obtenida de un ecosistema natural mexicano.

### **3.3. Objetivos particulares.**

Elegir un fotobiorreactor para la captura de CO<sub>2</sub> y la obtención de biomasa microalgal.

Estudiar el efecto de la irradiancia, flujo y concentración de CO<sub>2</sub> en el crecimiento de la comunidad de microalgas y la captura del CO<sub>2</sub> en el fotobiorreactor seleccionado.

Identificar morfológicamente a las microalgas más abundantes de la comunidad.

Realizar estudios preliminares para la obtención de aceites a partir de las microalgas.

## **CAPITULO 4. HIPÓTESIS.**

La comunidad de microalgas obtenida de Cuatro Ciénegas, Coahuila es eficiente en la captura de CO<sub>2</sub>.

La irradiancia, flujo de aire y concentración de CO<sub>2</sub> son factores que tienen influencia en la tasa de crecimiento de las microalgas y la captura del CO<sub>2</sub> en el sistema.

## CAPITULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

En este capítulo se describen la metodología y la forma física del sistema experimental probado, además se presenta paso a paso los métodos analíticos empleados.

### 5.1 Microalgas.

Cuatro Ciénegas es un valle localizado en el centro del desierto de Chihuahua que constituye un oasis, ya que conforma una serie de pozas y ríos, en las que una característica importante es la presencia de diferentes comunidades microbianas incluyendo estromatolitos vivos que forman parte de la cadena trófica que sostiene a diversos invertebrados (Falcón *et al.*, 2007).

La comunidad de microalgas fue cosechada de la laguna Churince (26°50'25"N; 102°08'02"O) localizada a 19.5 Km al sur-oeste de Cuatro Ciénegas, Coahuila (Rodríguez-Almaraz *et al.*, 1997).

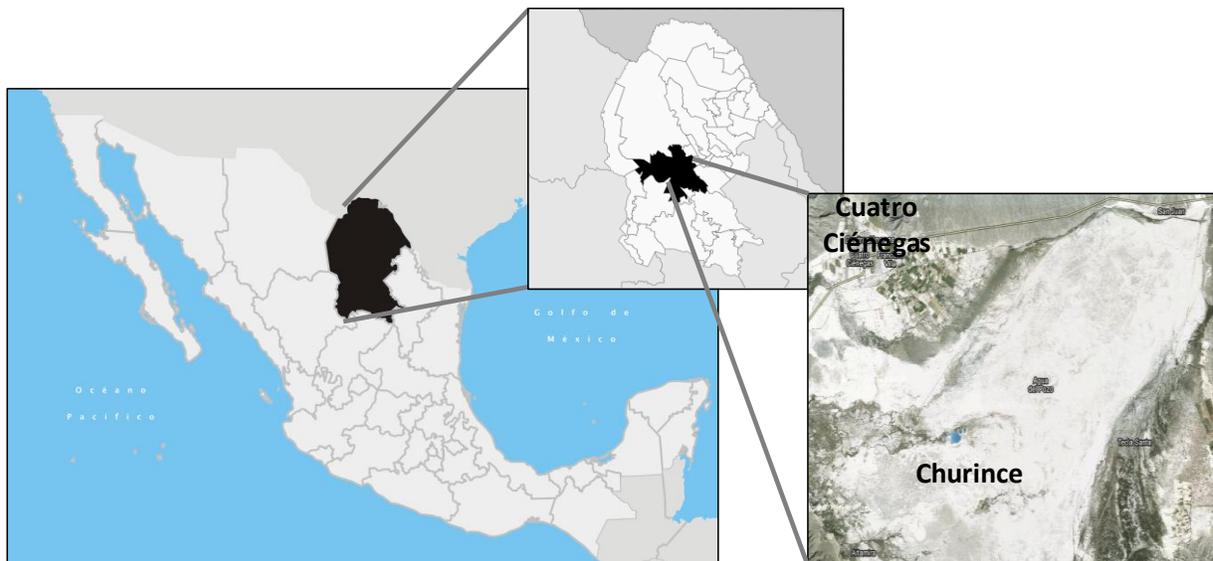


Figura 12. Muestra la localización de la laguna de Churince, adaptada de Falcón *et al.*, 2007.

## 5.2. Propagación y medio de cultivo.

La comunidad de microalgas se propagó en matraces de 500 mL con medio de cultivo BG-11 (tabla 6) estéril, a pH 7.5. A una temperatura de incubación de 28 a 30°C, bajo iluminación continua artificial de 3260 Lx.

Tabla 6. Composición del medio de cultivo.

<b>Medio de cultivo BG11</b>			
NaNO <sub>3</sub>	1.5 g L <sup>-1</sup>	<b>Metales traza A5+Co</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	0.04 g L <sup>-1</sup>		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075 g L <sup>-1</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g
EDTA disódico de magnesio	0.001 g L <sup>-1</sup>	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.036 g L <sup>-1</sup>	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.222 g
Ácido cítrico	0.006 g L <sup>-1</sup>	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.39 g
Citrato de amonio férrico	0.006 g L <sup>-1</sup>	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.079 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02 g L <sup>-1</sup>	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	49.4 mg
Metales traza A5+Co	1 mL	Agua destilada	1.0 L

## 5.3. Sistema experimental y parámetros de operación.

El sistema experimental que se instaló constó de un fotobiorreactor airlift con tubo concéntrico (ALR) y un fotobiorreactor de columna de burbuja (BCR) de vidrio, ambos con un volumen de operación de 2.5 L, colocados dentro de una cámara equipada con 16 lámparas de luz de día de 40 W. Las medidas y parámetros de operación de cada uno de ellos se presentan en la figura 13 y tabla 7. En la figura 14 se muestra en conjunto el sistema experimental.

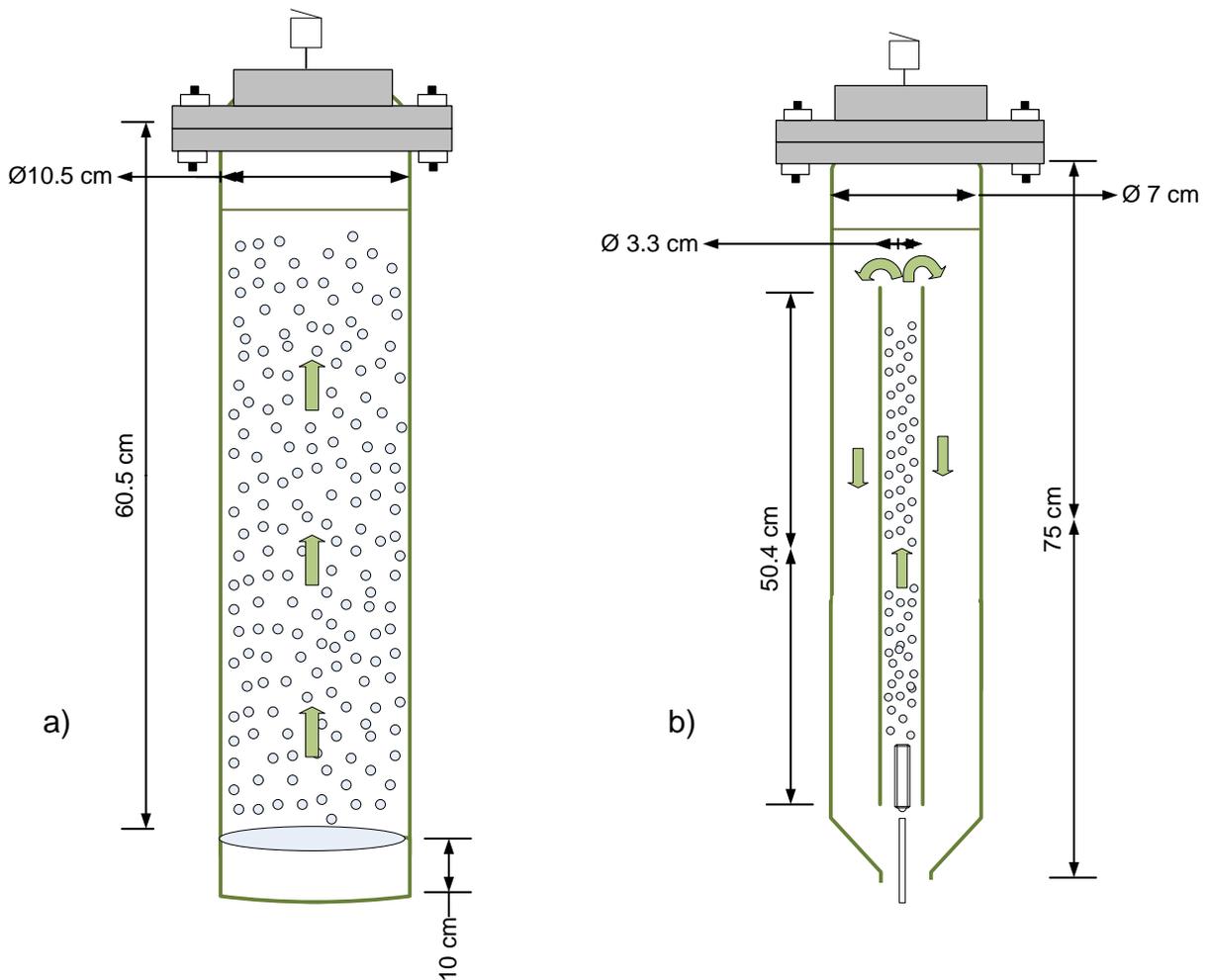


Figura 13. Configuración de los fotobiorreactores utilizados a) Fotobiorreactor de columna de burbujas, b) Fotobiorreactor airlift.

Tabla 7. Parámetros de operación de los fotobiorreactores.

	<b>BCR</b>	<b>ALR</b>
Diámetro.	0.105 m	0.07 m
Volumen de operación.	0.0025 m <sup>3</sup>	0.0025 m <sup>3</sup>
Intensidad de luz.	3260 Lx	3260 Lx
Diámetro del tubo concéntrico.	----	0.033 m
Altura del tubo concéntrico.	----	0.0504 m
Altura.	0.705 m	0.75 m
KLa.	0.0065 s <sup>-1</sup>	0.0115 s <sup>-1</sup>
Velocidad superficial (U <sub>G</sub> ).	0.00384 m s <sup>-1</sup>	0.00867 m s <sup>-1</sup>
Flujo.	0.8 vvm	0.8 vvm
Área iluminada.	0.232 m <sup>2</sup>	0.165 m <sup>2</sup>
Temperatura.	30°C	30°C

vvm: volumen del gas por volumen del reactor por minuto.

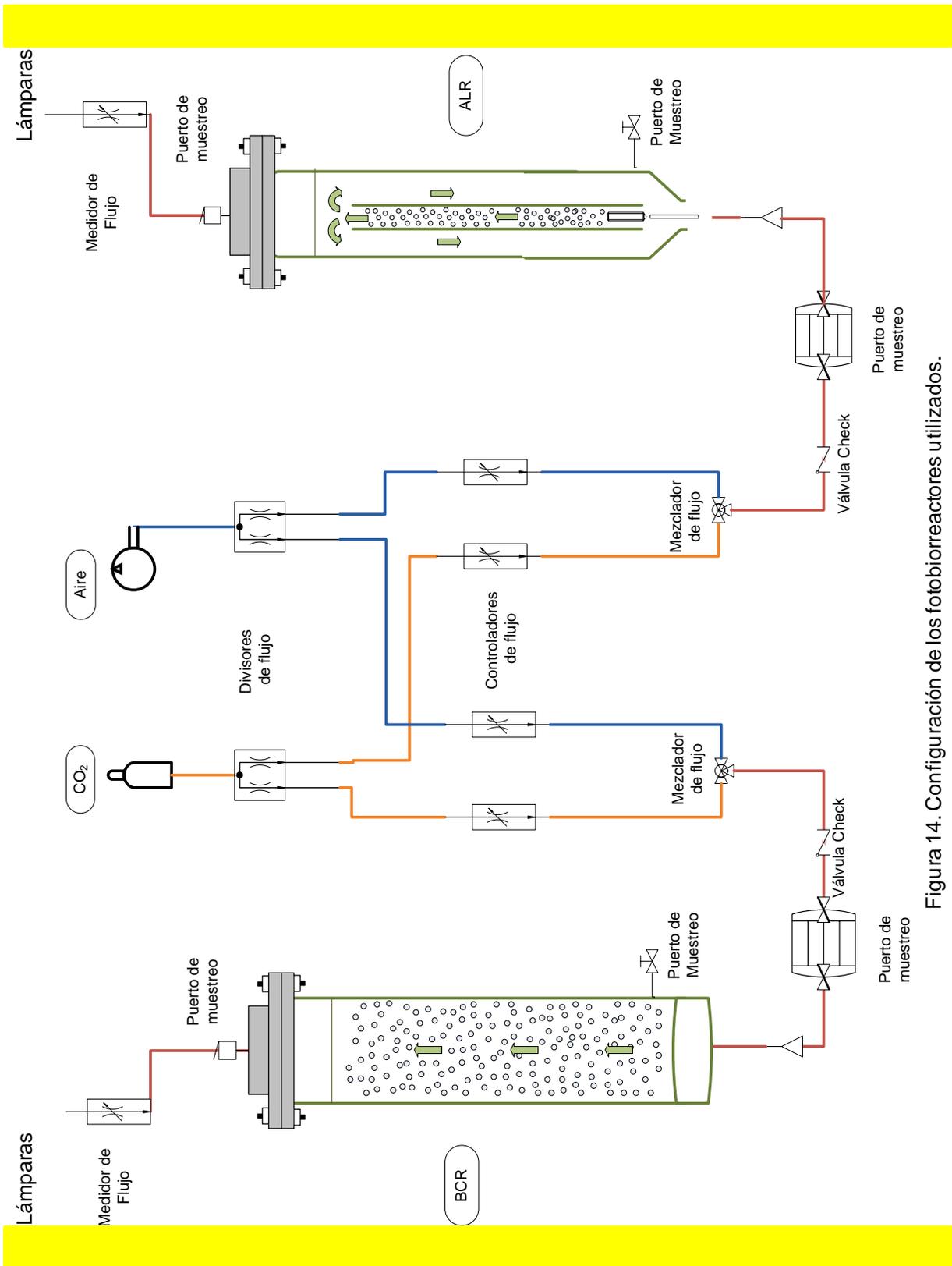


Figura 14. Configuración de los fotobiorreactores utilizados.

#### 5.4. Limpieza de los reactores.

Antes de cada experimento los reactores se limpiaron, para eliminar los posibles residuos de suciedad y biomasa provenientes de experimentos anteriores, llenando con una mezcla de agua y ácido clorhídrico concentrado (40 mL al 35 % p/p HCl), dejando airear la mezcla por al menos 12 h. Posteriormente los reactores se vaciaron y enjuagaron con agua destilada. Para su esterilización, los reactores fueron lavados con agua destilada y 30 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 10 %, después fueron vaciados y enjuagados con agua estéril. (Sánchez *et al.*, 2002)

#### 5.5. Definición de los parámetros cinéticos y de captura de CO<sub>2</sub>.

Para evaluar la captura de CO<sub>2</sub> en los reactores se define el porcentaje de remoción de CO<sub>2</sub> y la capacidad de eliminación o captura de CO<sub>2</sub>, a través de las siguientes ecuaciones.

Porcentaje de remoción de CO<sub>2</sub>:

$$\%R_{CO_2} = \frac{CO_{2E} - CO_{2S}}{CO_{2E}} \times 100$$

Capacidad de eliminación o captura de CO<sub>2</sub>:

$$CE_{CO_2} = \frac{[(P_o + P_1 + P_H)Y_{CO_2E} - P_o Y_{CO_2S}]F M_{CO_2}}{R * T * V}$$

donde  $CO_{2E}$  es la concentración de CO<sub>2</sub> a la entrada de los reactores,  $CO_{2S}$  es la concentración de CO<sub>2</sub> a la salida de los reactores (g m<sup>-3</sup>);  $P_o$  es la presión atmosférica,  $P_1$  es la presión de la placa de vidrio del BCR,  $P_H$  es la presión de la columna de agua (atm),  $M_{CO_2}$  es el peso molecular del CO<sub>2</sub> (g mol<sup>-1</sup>),  $F$  es el flujo de entrada a los reactores (m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>),  $V$  es el volumen del medio de cultivo (m<sup>3</sup>),  $R$  es la

constante universal de los gases ( $\text{atm L mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ),  $Y_{CO_2}$  es la fracción mol a la entrada o salida del reactor (adimensional) y  $T$  es la temperatura del sistema (K).

Los valores de biomasa medidos fueron usados para construir curvas de crecimiento de biomasa *versus* tiempo, y para calcular la tasa máxima de crecimiento específico ( $\mu_{max}$ ) con la siguiente ecuación:

$$\mu_{max} = \frac{\ln X_t - \ln X_o}{t - t_o}$$

La productividad fue calculada como productividad máxima ( $P_{max}$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P_{max} = \frac{X_t - X_o}{t - t_o}$$

donde  $X_o$  es la concentración inicial de biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ) al tiempo  $t_o$  (d) y  $X_t$  es la concentración de biomasa en  $\text{g L}^{-1}$  en cualquier tiempo  $t$  (de Morais y Costa, 2007b).

La tasa de fijación de  $CO_2$  ( $P_{CO_2}$ ) se evaluó con la relación entre el contenido de carbono en las células y la productividad de biomasa de las microalgas, de acuerdo con la siguiente ecuación.

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

donde  $M_{CO_2}$  es el peso molecular del  $CO_2$ ,  $M_C$  es el peso molecular del carbono y  $C_c$  es la cantidad de carbono en las células.

## 5.6. Determinaciones analíticas.

Con el objeto de conocer el estado de operación de los fotobiorreactores, se realizaron las siguientes determinaciones analíticas.

### 5.6.1. Velocidad de flujo y monitoreo del CO<sub>2</sub>.

Los reactores fueron alimentados con una mezcla de CO<sub>2</sub> grado industrial y aire proveniente de un compresor, a concentraciones de 5 y 10% de CO<sub>2</sub> v/v, el flujo de la mezcla se ajustó con rotámetros (Cole Parmer calibrados a condiciones estándar)

Las concentraciones de CO<sub>2</sub> a la entrada y salida de los fotobiorreactores fueron determinadas por cromatografía de gases (Jacob-Lopes *et al.*, 2009a). El equipo que se utilizó es un Cromatógrafo Agilent Technologies de la serie 6890 equipado con una columna Q 80/100 empacada con porapack y un detector de conductividad térmica. Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperaturas de inyector y detector de 110 °C y 160 °C, respectivamente, con una temperatura de 125 °C en la columna. El gas acarreador fue helio con una velocidad de flujo de 6.9 mL min<sup>-1</sup>.

Para determinar el CO<sub>2</sub> removido se tomó una muestra de 100 µL de la fase gaseosa del sistema, la cual fue inyectada en el cromatógrafo de gases, las áreas obtenidas fueron comparadas con una curva de referencia para determinar la concentración del CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa. La ecuación de la recta obtenida fue:

$$y = 223.1 + 28.372 x$$

donde  $y$  es el área de respuesta,  $x$  es la concentración de CO<sub>2</sub> en g m<sup>-3</sup> con un coeficiente de correlación,  $r^2$  de 0.995.

### *5.6.2. Medición de la intensidad de luz.*

La intensidad de luz incidente en el reactor se midió en la superficie externa de las columnas utilizando un medidor de luz de servicio (modelo 407026sp versión 2.2).

### *5.6.3. Análisis del carbono total.*

Para determinar la cantidad de carbono presente en la fase líquida del sistema, se tomaron muestras del medio de cultivo y se centrifugaron a 4500 rpm, el sobrenadante fue filtrado por una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Las muestras se inyectaron en un equipo analizador de carbono orgánico total TOC-V<sub>CSN</sub> (Total organic carbon analyzer) marca Shimadzu, que consta de una cámara de reacción, a 680°C rellena con un catalizador oxidante, donde el agua se evapora y el carbono se oxida a CO<sub>2</sub>. Este CO<sub>2</sub> se transporta, en corriente de aire y se mide en un analizador infrarrojo no dispersivo. Dado que con el procedimiento anterior solo se determina el carbono total, se debe medir también el carbono inorgánico, el cual se midió inyectando la muestra en una cámara de reacción distinta, que contiene ácido fosfórico, de tal manera que, bajo condiciones ácidas todo el carbono inorgánico se convierte en CO<sub>2</sub>, que se evalúa en el analizador infrarrojo.

### *5.6.4. Monitoreo del pH y temperatura.*

El pH se monitoreó a lo largo de los experimentos por medio de un electrodo, previamente calibrado con soluciones buffer estándar de pH 4 y pH 7. La temperatura del medio de cultivo se determinó con un termómetro, justo en el momento en el que se midió el CO<sub>2</sub> de entrada y salida del reactor.

#### 5.6.5. Determinación de la biomasa.

Para cuantificar la biomasa a lo largo de los experimentos se usó el método gravimétrico de la determinación del peso seco (Solovchenko *et al.*, 2007), el cual se basa en colocar la muestra en una membrana a peso constante, y secar en un horno las muestras hasta peso constante, y por diferencia de peso obtener la materia seca contenida.

Se llevó a peso constante una membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se filtraron 40 mL del medio de cultivo, se dejó secar por 24 horas en una estufa a una temperatura de 60°C, terminado el tiempo de secado, la membrana fue colocada en un desecador durante 1 hora y se pesó nuevamente.

#### 5.6.6. Recuperación de la biomasa.

La floculación de las algas por medio de quitosano es una opción para la recuperación de la biomasa microalgal, ya que las microalgas tienen cargas negativas que previenen la agregación de las células en suspensión, las cargas de la superficie pueden ser neutralizadas añadiendo un floculante como los polímeros catiónicos (Molina *et al.*, 2003). Divakaran y Sivasankara (2002) concluyeron que el quitosano es efectivo en la floculación de las especies *Spirulina* sp., *Oscillatoria* sp. y *Chlorella* sp., determinando que la cantidad requerida de quitosano depende de la concentración celular y que la máxima eficiencia en la floculación es alcanzada alrededor de un pH de 7.

La biomasa de cada lote del reactor se cosechó floculando las células con quitosano. Primero se midió el pH del medio de cultivo y se ajustó en un rango de 7.4-7.6 con HCl o CaCO<sub>3</sub>, según fuera el caso, posteriormente se diluyeron 100 mg de quitosano en 10 mL de HCl (0.1 M) y se aforó a 100 mL con agua destilada. Posteriormente la

solución quitosano/HCl/agua se combinó con 400 mL del cultivo y se dejó en agitación durante 30 min. El cultivo se filtró al vacío con papel filtro Whatman No 50 y se dejó secar en una estufa a una temperatura de 60 °C durante 24 horas.

#### 5.6.7. Cuantificación y extracción de los aceites.

La biomasa de cada lote del reactor se cosechó floculando con quitosano y filtrando de acuerdo al procedimiento anterior, posteriormente se extrajeron los aceites utilizando el método de Soxhlet, realizando repetidos lavados de las células secas (previamente pulverizadas) con éter anhidro (Molina *et al.*, 2003; Miao y Wu., 2006; Su *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). El procedimiento realizado fue el siguiente:

- 1) La biomasa seca fue molida y pasada por tamiz de malla de 1 mm.
- 2) 5 gramos de muestra ( $m$ ) fueron pesados en el dedal de extracción previamente pesado y tapado con algodón desgrasado.
- 3) El matraz de extracción fue lavado con éter y perfectamente seco, posteriormente se pesó ( $m_1$ ).
- 4) El matraz de extracción fue colocado en el sistema Soxhlet, el dedal en el tubo de extracción y se adicionó el éter anhidro.
- 5) Los aceites fueron extraídos con el solvente durante 6 horas a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/s.
- 6) Una vez terminada la extracción, el solvente fue eliminado por evaporación a baño María bajo campana y recuperándose el solvente por condensación.
- 7) Finalmente el matraz fue pesado con los aceites ( $m_2$ ) y se calculó el porcentaje de aceites mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Aceites} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100$$

## CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este capítulo se presentan los datos experimentales obtenidos durante la operación de los fotobiorreactores, la elección del sistema experimental y los factores analizados para la captura del CO<sub>2</sub>.

### 6.1 Elección del sistema.

Los reactores ALR y BCR con 2.5 L de medio BG11, fueron inoculados con 20 mL de medio de cultivo de la comunidad de microalgas colectadas (2.4 mg L<sup>-1</sup>) y alimentados con una mezcla CO<sub>2</sub>-aire al 10% de CO<sub>2</sub>, a un flujo de 0.8 vvm e intensidad de luz continua de 3260 Lx. Durante 25 días se monitoreó la biomasa, el pH, temperatura y la concentración de CO<sub>2</sub> de entrada y salida, además se analizaron las capacidades de captura y el porcentaje de remoción del CO<sub>2</sub> en los fotobiorreactores (FBRR).

La fase de crecimiento lineal se observó entre los 5 y 20 días para el ALR y entre los 5 y 22 días para el BCR (figura 15). Las tasas lineales de crecimiento ( $\mu$ ) calculadas fueron  $\mu = 210.65 \text{ g m}^{-3}\text{d}^{-1}$  y  $200.72 \text{ g m}^{-3}\text{d}^{-1}$ , para los reactores ALR y BCR respectivamente, en ambos casos con  $r^2 \geq 0.99$ . En la figura 15 se observa que la biomasa final del experimento para el BCR fue de  $3.8 \text{ Kg m}^{-3}$  y  $2.55 \text{ Kg m}^{-3}$  para el ALR. La biomasa obtenida en los fotobiorreactores fue mayor a lo reportado para microalgas verdes (Clorophyta), bajo condiciones similares. de Morais y Costa (2007b), reportan  $2.2 \text{ Kg m}^{-3}$  para *Scenedesmus obliquus* y  $1.6 \text{ Kg m}^{-3}$  para *Chlorella kessleri* al cultivarlas en FBRR tubulares con 12% de CO<sub>2</sub> v/v, volumen de operación de 1.8 L e iluminación de 3200 Lx, durante 20 días. No se observó crecimiento exponencial fundamentalmente debido al efecto negativo de la cantidad de luz disponible sobre el crecimiento.

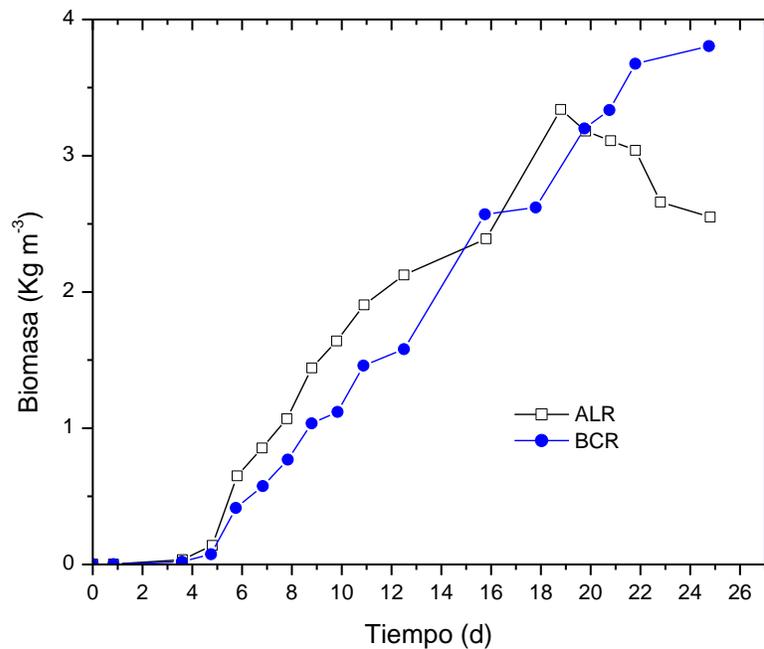


Figura 15. Curva de crecimiento, biomasa suspendida en peso seco ( $\text{Kg m}^{-3}$ ) vs tiempo (d) en los fotobiorreactores BCR y ALR, con suministro de 10 % de  $\text{CO}_2$  v/v.

El pH del medio de cultivo puede afectar la absorción del  $\text{CO}_2$  y el crecimiento de los microorganismos, ya que puede afectar la disponibilidad de los nutrientes, su transporte a través de la membrana citoplasmática, la actividad enzimática, el transporte de electrones durante la fotosíntesis y la respiración de las microalgas. Por lo anterior el pH fue monitoreado durante el experimento, obteniendo un promedio de  $7 \pm 0.4$  para el ALR y de  $6.95 \pm 0.37$  para el BCR, lo cual es consistente con lo reportado para las especies *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella kessleri*,  $7.8 \pm 0.68$  y  $6.48 \pm 0.45$  respectivamente (de Morais y Costa, 2007b).

Las capacidades máximas de captura de  $\text{CO}_2$  observadas fueron de  $21.98 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para el BCR y  $26.38 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para el ALR. Como se observa en la figura 16, la capacidad de captura del ALR disminuyó a partir del día 19, lo que concuerda con la disminución en la biomasa suspendida en el reactor (figura 15). Esto puede ser atribuido a la formación de biopelículas en las paredes del fotobiorreactor que impidieron la incidencia de luz al reactor. De la misma manera se observó una caída

en los porcentajes de remoción de CO<sub>2</sub> en el ALR, siendo los máximos valores observados 15.1% y 10.8 % para el ALR y BCR respectivamente.

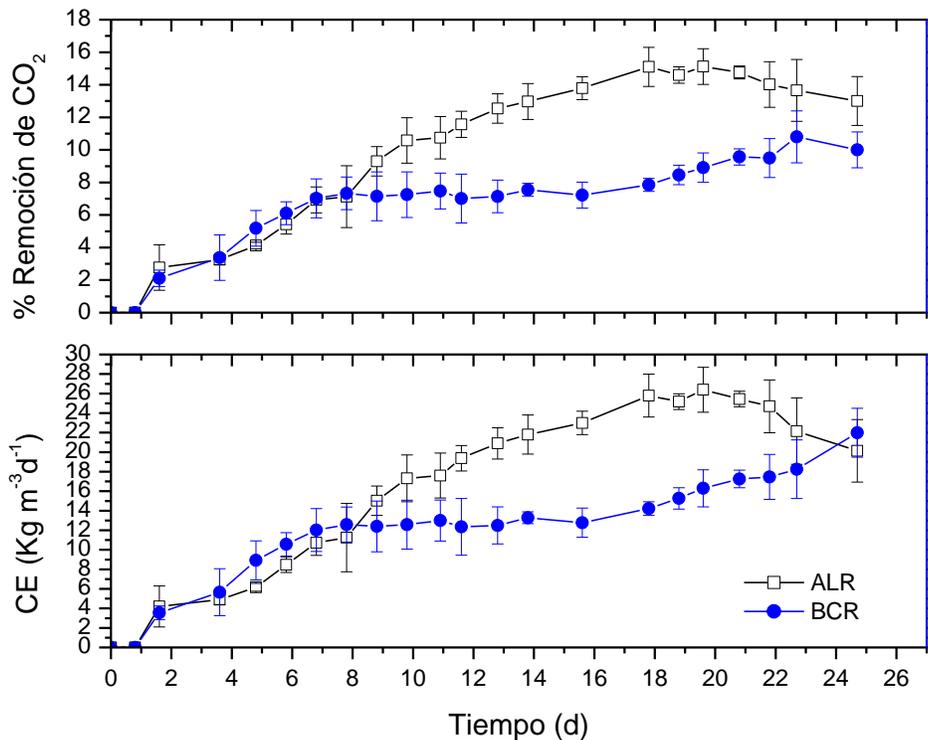


Figura 16. Evolución de la captura de CO<sub>2</sub> (CE) y porcentaje de remoción, suministrando 10% de CO<sub>2</sub> v/v en ALR y BCR.

Posteriormente se realizó un segundo experimento con 5 % CO<sub>2</sub>, inoculando los FBRR con 500 mL del medio de cultivo obtenido del experimento anterior (10% de CO<sub>2</sub>), dando una concentración celular inicial de 740 g m<sup>-3</sup>. Las tasas de crecimiento lineales fueron de 193.3 g m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> y 175.8 g m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para el BCR y el ALR, respectivamente con una  $r^2 \geq 0.97$  en ambos casos. En el reactor ALR se produjo una biomasa total de 3.25 Kg m<sup>-3</sup> y en el BCR de 3.9 Kg m<sup>-3</sup> (figura 17), lo cual fue mayor a lo reportado por de Morais y Costa (2007b) para la especie *Chlorella vulgaris* (1.31 Kg m<sup>-3</sup>), al cultivarlas en condiciones similares en fotobiorreactores tubulares con 6% de CO<sub>2</sub> volumen de 1.8 L e iluminación de 3200 Lx durante 20 días.

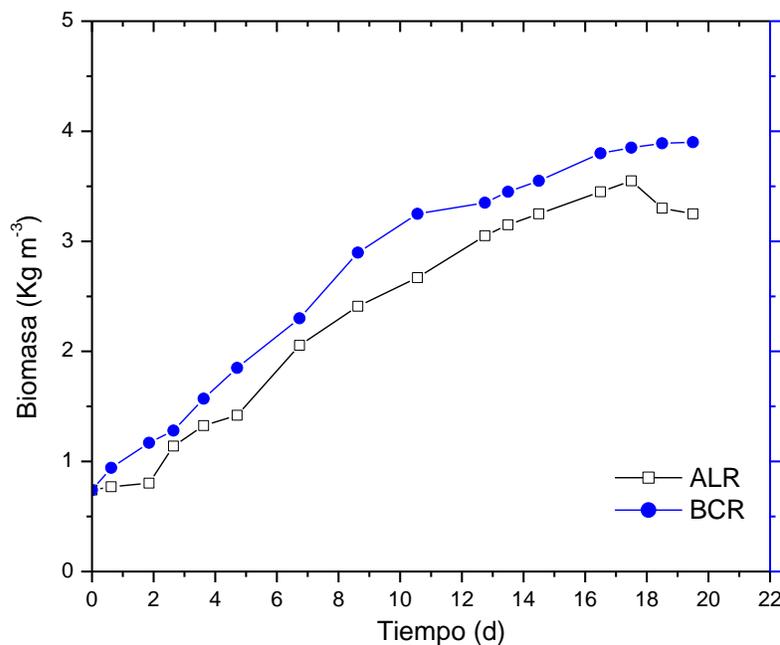


Figura. 17 Curva de crecimiento: biomasa suspendida en peso seco ( $\text{Kg m}^{-3}$ ) vs tiempo (d) en los fotobiorreactores BCR y ALR, con suministro de 5 % de  $\text{CO}_2$  v/v.

El pH del medio de cultivo en el ALR se mantuvo en un promedio de  $7.28 \pm 0.19$  y en el BCR de  $7.15 \pm 0.18$ , lo cual también es consistente con lo reportado para otras especies de microalgas cultivadas en fotobiorreactores (de Morais y Costa, 2007b). En estos experimentos se pudo observar un comportamiento similar en el reactor ALR, teniendo un incremento gradual en las biomasa, capacidad de captura y porcentaje de remoción en el sistema y un descenso en la capacidad de captura del  $\text{CO}_2$ , debido a la disminución en la concentración de nutrientes o por la reducción de la incidencia de luz, al incrementarse la concentración celular. La formación de biopelículas seguramente contribuyó a reducir también la disponibilidad de la energía luminosa. Las capacidades de captura máximas de  $\text{CO}_2$  registradas fueron de  $17.13$  para el ALR y  $20.8 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  para el BCR, mientras que los porcentaje de remoción fueron de  $21.2$  y  $24.1\%$  para el BCR y ALR, respectivamente.

En la tabla 8 se resumen los resultados obtenidos por Jacob-Lopes *et al*, 2009a en la operación de los fotobiorreactores ALR y BCR con la misma configuración, en la

remoción de CO<sub>2</sub> con la microalga *Aphanothece microscopica* (Cyanobacteria), bajo las siguientes condiciones de operación, 1 vvm, 2.4 L de medio BG11, 15 % CO<sub>2</sub> v/v y 150 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (11100 Lx). Al comparar sus resultados con los obtenidos en este estudio, podemos ver que la CE fue menor con esta comunidad de microalgas, pero es importante tomar en cuenta que la captura de CO<sub>2</sub> en fotobiorreactores, depende principalmente de la especie de microalga cultivada y la concentración de CO<sub>2</sub> en el flujo suministrado. Por otro lado tales autores reportaron que durante la operación de los reactores se observó la formación de biopelículas en las paredes de ambos, pero en mayor proporción en el BCR, caso contrario a lo que se observó en este estudio.

Tabla 8. Comparación de las capacidades de captura y remoción de CO<sub>2</sub>, en los FBRR.

Reactor	% CO <sub>2</sub>	% R <sub>max</sub>	CE <sub>max</sub> (Kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	X <sub>max</sub> (Kg m <sup>-3</sup> )	Referencia
ALR	15	26.9	66.8	5.3	Jacob-Lopes <i>et al</i> 2009a.
	10	15.1	26.3	3.3	Este estudio.
	5	24.1	17.1	3.5	Este estudio.
BCR	15	24	64.1	5.1	Jacob-Lopes <i>et al</i> 2009a.
	10	10.8	21.98	3.8	Este estudio.
	5	21.2	20.8	3.9	Este estudio.

Por los anteriores resultados se decidió trabajar únicamente con el reactor BCR, en los siguientes experimentos, debido a que no fomenta la formación de biopelículas en las paredes del reactor, para este caso en particular, esto considerando que la formación de biopelículas no es deseada ya que la aglomeración de las células, reduce la penetración de la luz y consecuentemente disminuye el rendimiento de la remoción de CO<sub>2</sub>, incrementa los problemas de mezclado en el reactor y con ello se reduce el área por unidad de volumen celular que es capaz de recibir la energía luminosa, lo que conlleva a la reducción en la reacción de fijación del carbono.

## 6.2 Identificación.

El inóculo inicial contenía microalgas pertenecientes a las divisiones Cyanobacteria (filamentosas) y Chlorophyta, pero con abundancia de las primeras (figura 18). En observaciones al microscopio se observó que las Cyanobacteria no crecieron en los FBRR, lo cual explica el desarrollo tan lento del cultivo en los primeros 5 días de operación (figura 15).

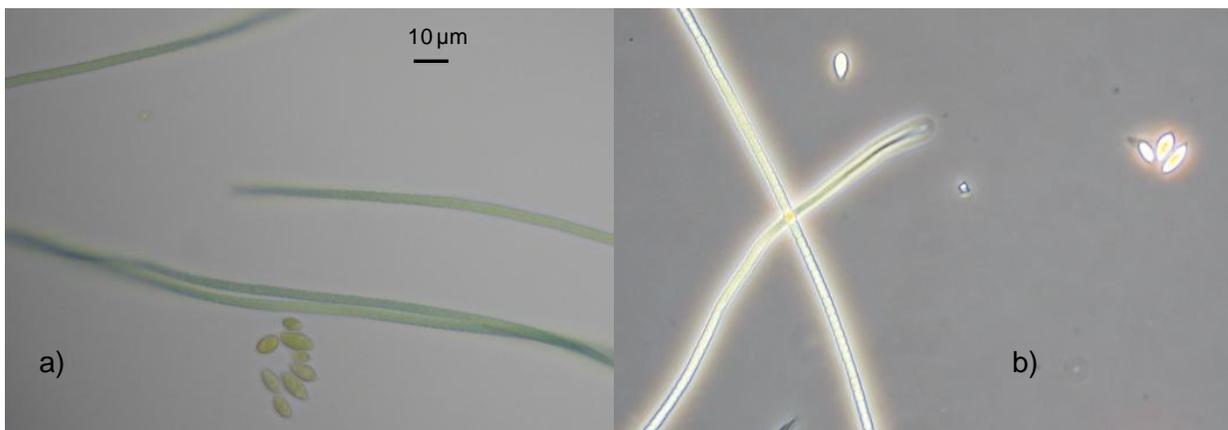


Figura 18. Inóculo inicial. a) 63x y zoom de 1.4. b) Contraste de fases a 63x y zoom de 1.4.

Tomando en cuenta que existe un reporte que señala que las Cyanobacteria tienden a dominar cuando las concentraciones de  $\text{CO}_2$  son bajas (pH alto); mientras que, cuando el  $\text{CO}_2$  es alto (pH bajo) dominan las microalgas flageladas y que niveles de  $\text{CO}_2$  intermedios (pH neutro) benefician a microalgas Chlorophyta no flageladas (Caraco y Miller, 1998), es probable que las Cyanobacteria compitieran con las microalgas eucariotas (Chlorophyta), llegando a dominar las últimas al presentar una mayor tasa de crecimiento y habilidad para captar los nutrientes.

Al término de los experimentos anteriores se observó, que la comunidad de microalgas original se había transformado en un cultivo prácticamente unialgal (color verde intenso), por lo que se decidió identificarla siguiendo las claves de Bourrelly (1985), esto observando bajo el microscopio óptico el nivel de organización del alga y

sus estructuras morfológicas como cloroplastos, pirenoides, espinas y su manera de reproducción. Se corroboró que la microalga pertenecía a la división Chlorophyta, al dar positiva la prueba de tinción con lugol, usada para diferenciar las clases Chlorophyceae de todas las demás, la cual consiste en agregar una gota de lugol sobre la muestra, que al interactuar con el almidón y los cloroplastos de las Chlorophyceae, se tornan de un color café oscuro (figura 19 y 21) y las otras no.

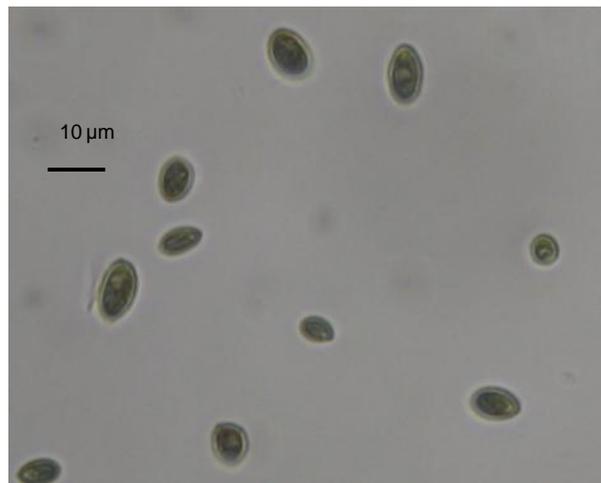


Figura 19. Células obtenidas del fotobiorreactor teñidas con Lugol, a 63 x y zoom de 2.2.

Posteriormente se determinó que el alga pertenecía al Orden Chlorococcales, ya que eran organismos unicelulares inmóviles, con formación de colonias también inmóviles, que se multiplican por la formación de autosporas (figura 20a y 21a) y raramente por división simple vegetativa (figura 20b, 21b).

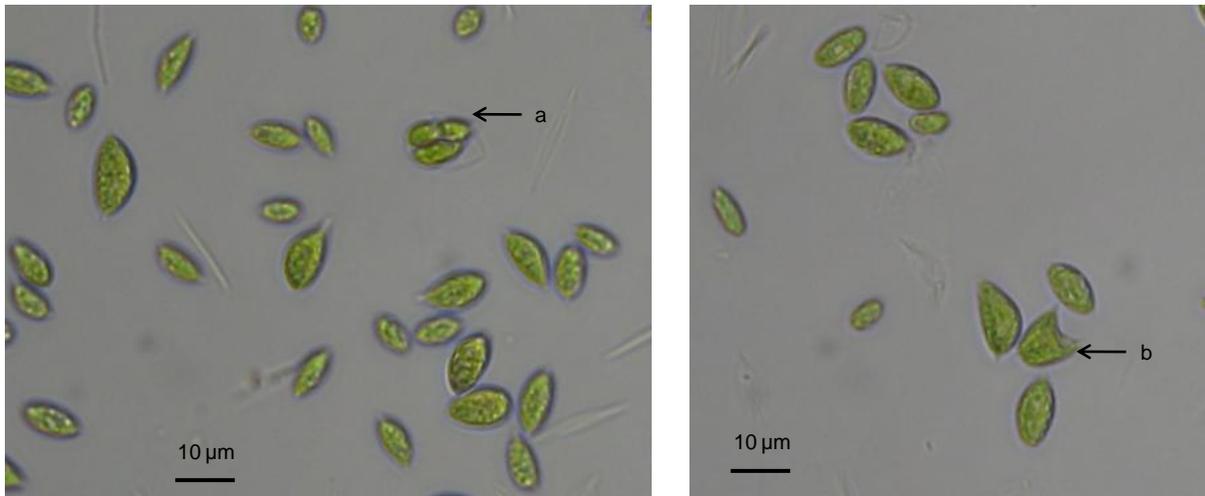


Figura 20. a) Células formando autosporas, b) Célula en división.

Imágenes tomadas a 63 x y zoom de 2.2.

Se reconoció que la microalga pertenecía a la Familia Coccomyxaceae, caracterizada por tener una división vegetativa asociada a la formación de autosporas (figura 20 y 21). Finalmente se determinó que la microalga pertenecía al género *Ourococcus* Grobéty, ya que sus células eran fusiformes, solitarias, con pequeñas espinas en los ápices, de forma sigmoidea, sin vaina gelatinosa, con cloroplasto parietal y con un pirenoide que a veces es difícil de observar y medir.

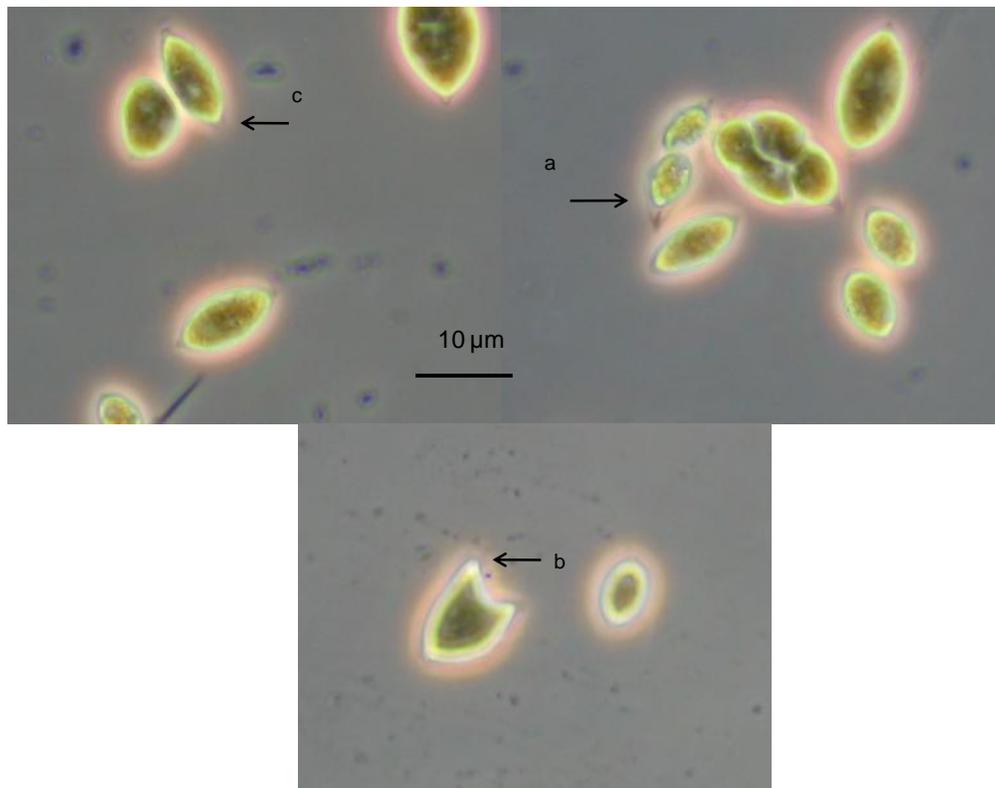


Figura 21. a) Célula formando autosporas, b) En división, c) Proyecciones. Contraste de fases con tinción de lugol, 100 x y zoom 2.2.

El género *Ourococcus* Grobéty tiene las siguientes especies descritas: *Ourococcus bicaudatus* Grobéty, *Ourococcus insignis* Lindley y *Ourococcus multisporus* H.W. Bischoff et H.C. Bold. Se realizó un estudio morfométrico, para poder comparar a la especie de *Ourococcus*, tomando varias fotografías y midiendo las células aleatoriamente en ancho, largo y el tamaño de las proyecciones de los ápices (figura 18c). En promedio las células midieron 11µm de largo, 5.8 µm de ancho y las proyecciones 1.3 µm. En la figura 18b podemos observar una fotografía de *Ourococcus multisporus* obtenida de <http://www.utex.org/>, las medidas de la microalga son: 11.74 µm de largo, 5.74 µm de ancho y tiene unas proyecciones muy cortas en los ápices de 0.95 µm de longitud, medidas muy cercanas a las presentadas por la microalga *Ourococcus* sp. (figura 18a).

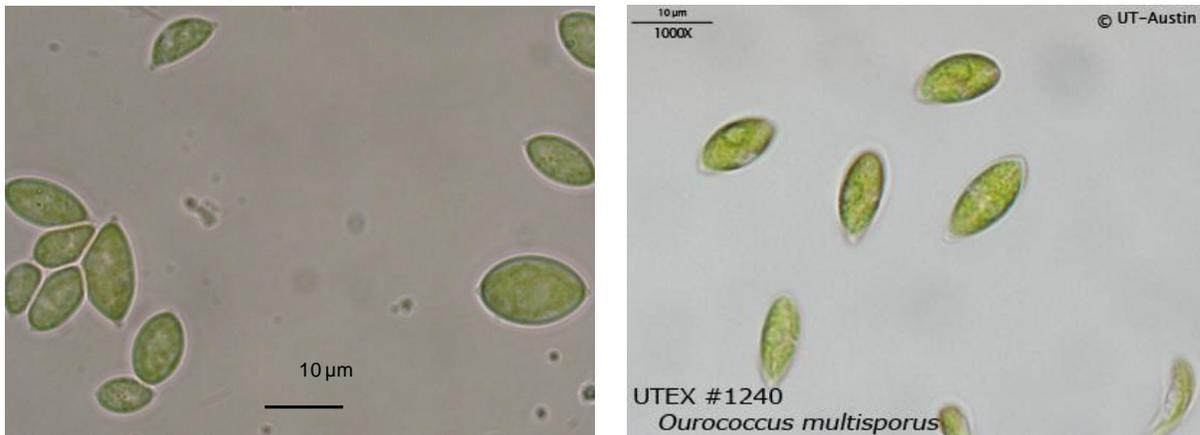


Figura 22 a): *Ourococcus* sp., Cuatro Ciénegas Coahuila, b) *Ourococcus multisporus*, colección cultivos de algas de la Universidad de Texas en Austin.

### 6.3 Efecto de la irradiancia.

En cultivos fotosintéticos la cantidad de luz recibida por las células tiene una relación directa con la capacidad para fijar  $\text{CO}_2$  y por consecuencia determinan la productividad de biomasa y la tasa de crecimiento. En un ambiente natural las células están expuestas a ciclos de luz-oscuridad determinado por el día y la noche. Para ver el efecto de la irradiancia sobre la capacidad de captura de  $\text{CO}_2$  y el crecimiento de la microalga *Ourococcus* sp. se mantuvo el suministro de luz constante ya que Jacob-Lopes *et al*, 2009b encontraron que los máximos valores de productividad de biomasa así como de fijación de  $\text{CO}_2$  se alcanzan bajo un régimen continuo de iluminación. Se realizó un diseño factorial 3x2 (figura 23) tomando como factores, la intensidad de luz, a tres niveles: 3260, 5620 y 8000 Lx y el suministro de  $\text{CO}_2$  a 5 y 10 % v/v, a un flujo de 0.4 vvm. Se analizaron los parámetros cinéticos, porcentaje de remoción y captura de  $\text{CO}_2$ , mediante un análisis de varianza (ANOVA) el cual se reporta en el anexo 1D.

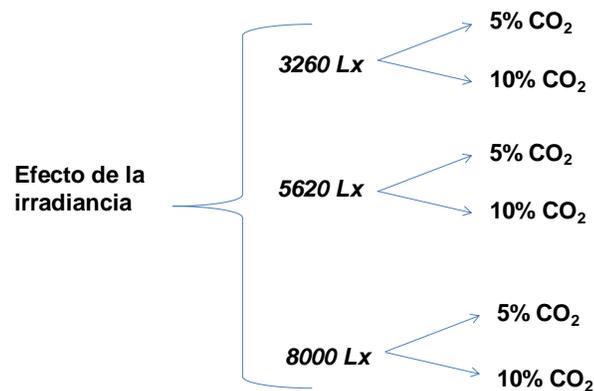


Figura 23. Diseño factorial, para determinar el efecto de la intensidad de luz, el suministro de CO<sub>2</sub> y su interacción.

A continuación en la tabla 9 se muestran las medias obtenidas para todos los parámetros, mientras que los intervalos de confianza se reportan en el anexo 1B.

Tabla 9. Parámetros obtenidos a distintas intensidades de luz con suministro de 5 y 10% CO<sub>2</sub> v/v.

Parámetros	3260 Lx	5620 Lx	8000 Lx	3260 Lx	5620 Lx	8000 Lx
	5 % CO <sub>2</sub>	5 % CO <sub>2</sub>	5 % CO <sub>2</sub>	10 % CO <sub>2</sub>	10 % CO <sub>2</sub>	10 % CO <sub>2</sub>
$X_{\max}$ (g L <sup>-1</sup> )	3.37	3.12	6.00	3.1	2.7	5.7
$P_{\max}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	0.25	0.32	0.50	0.26	0.31	0.52
$\mu_{\max}$ (d <sup>-1</sup> )	0.18	0.23	0.37	0.18	0.34	0.38
$P_{\text{CO}_2}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	0.47	0.60	0.95	0.49	0.57	0.97
$CE_{\max}$ (Kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	9.1	8.2	9.8	20.48	21.92	23.03
%R <sub>CO<sub>2</sub>max</sub>	12.8	14.2	14.4	19.27	22.23	21.18

ANOVA Pvalue < 0.0001.

En la figura 24 se muestra el perfil de captura y remoción de CO<sub>2</sub> al suministrar 10% de CO<sub>2</sub>, en los primeros 2 días el cultivo alcanzó el máximo reportado, pero con iluminación de 8000 Lx disminuyó de manera lineal del día 3 al 8, al finalizar el cultivo las CE fueron iguales a 5620 y 8000 Lx.

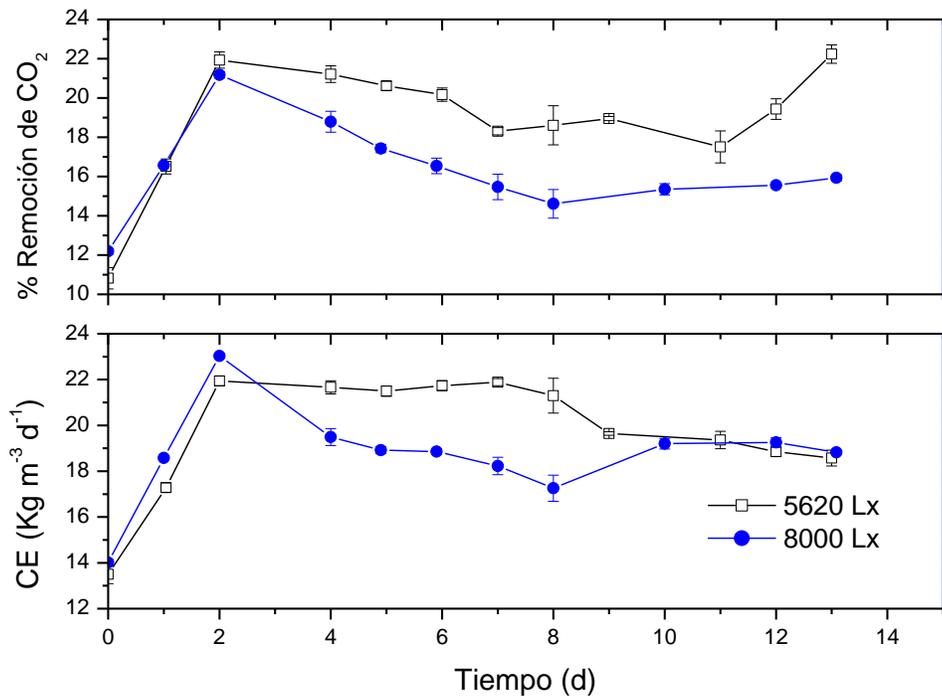


Figura 24. Porcentajes de remoción y capacidad de captura de CO<sub>2</sub>, suministrando 10% de CO<sub>2</sub> v/v a 5620 y 8000 Lx.

En la figura 25 con un suministro del 5% de CO<sub>2</sub> v/v, se observó que al incrementar la intensidad de luz de 3260 a 8000 Lx hubo un aumento en la capacidad de captura de CO<sub>2</sub>, sin embargo a partir del día 8 del cultivo se observó una disminución de la CE, esto se atribuye a la alta concentración celular que pudo impedir la incidencia de luz al interior del reactor. La biomasa máxima registrada fue 3.37 Kg m<sup>-3</sup> a 3260 Lx y de 6 Kg m<sup>-3</sup> a 8000 Lx. La máxima captura de CO<sub>2</sub> en el sistema fue de 9.1 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> y de 9.8 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> a 3260 y 8000 Lx respectivamente. Los porcentajes de remoción de CO<sub>2</sub> máximos observados fueron de 12.8% para 3260 Lx y 14.4 % a 8000 Lx.

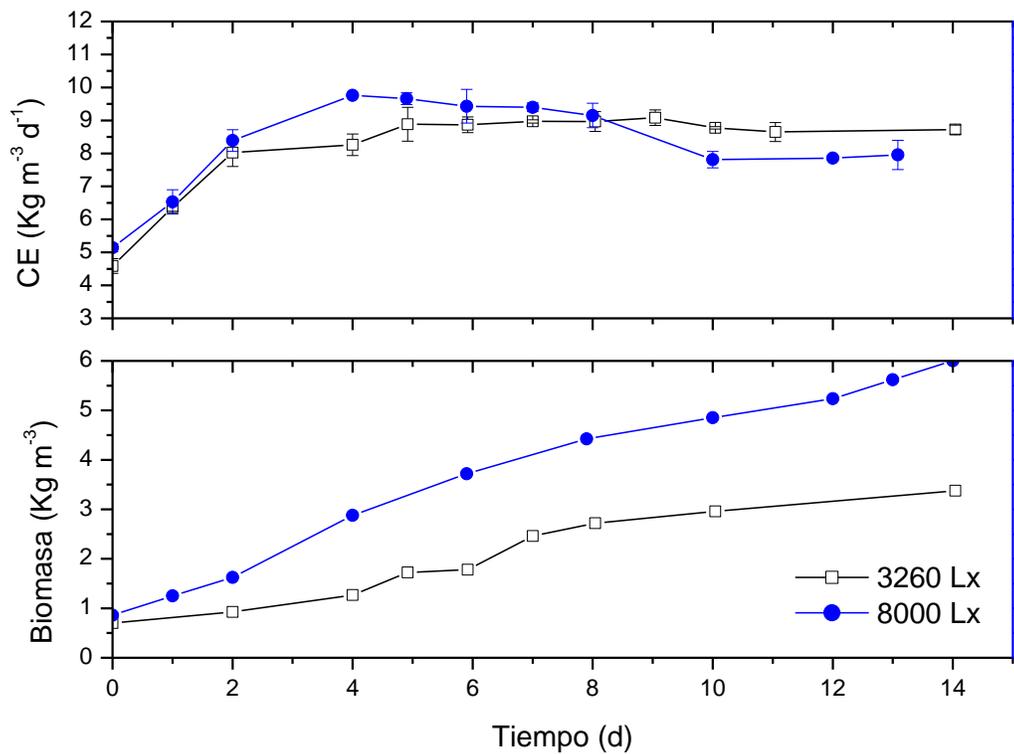


Figura 25. Evolución de la biomasa suspendida en peso seco y capacidad de captura de CO<sub>2</sub>, con suministro de 5% de CO<sub>2</sub> v/v a 3260 y 8000 Lx.

Con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para la interacción de los factores (anexo 1E), se comprobó que la biomasa máxima obtenida en todos los tratamientos fueron significativamente diferentes entre ellas, con excepción de la obtenida a 3260 Lx/10% de CO<sub>2</sub> y 5620 Lx/5% de CO<sub>2</sub>, que resultaron estadísticamente iguales. La mayor concentración de biomasa se obtuvo con el tratamiento de 8000 Lx y 5% CO<sub>2</sub>.

En el análisis de la productividad los datos experimentales mostraron que no existe diferencia entre el suministro de 5 o 10% de CO<sub>2</sub> a la misma intensidad de luz, en cambio si al aumentar la intensidad de luz, registrándose la mayor productividad a 8000 Lx.

Para el caso de la tasa de crecimiento específico, no se pudo corroborar la homogeneidad de varianzas (anexo 1C), sin embargo el software utilizado (SPSS, Statistical Package for the Social Sciences, Versión 11) es robusto para dicha

prueba, por lo tanto al corroborarse la distribución normal de los errores (anexo 1A), se decidió realizar la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, la cual mostró que de igual forma la  $\mu_{\max}$  se ve favorecida con el incremento en la intensidad de luz, y sólo se presenta diferencia significativa debido al suministro de CO<sub>2</sub> cuando se trabaja a 5620 Lx, siendo mayor al 10% de CO<sub>2</sub>.

Las tasa de fijación de CO<sub>2</sub> y la máxima captura de CO<sub>2</sub> resultaron ser significativamente diferentes al incrementarse la intensidad de luz, la mayor fijación de CO<sub>2</sub> en la biomasa y la mayor captura de CO<sub>2</sub> en el sistema se logró alimentando el reactor con 10% de CO<sub>2</sub> a 8000 Lx.

El análisis de los porcentajes de remoción evidenció que no hubo diferencias estadísticas al alimentar 5% de CO<sub>2</sub> con las tres intensidades de luz. La máxima remoción se logró al 10% de CO<sub>2</sub> con 5620 u 8000 Lx, ya que los valores resultaron ser estadísticamente iguales.

#### **6.4 Efecto del flujo de aire.**

El crecimiento celular se ve afectado por la cantidad de energía recibida, sin embargo, también depende de la disponibilidad de los nutrientes y de las condiciones hidrodinámicas del sistema, por ellos se decidió determinar el efecto del flujo de aire sobre la capacidad de captura y crecimiento de *Ourococcus* sp. El diseño factorial que se realizó se muestra en la figura 26, para el cual se tomaron como factores el flujo de la mezcla CO<sub>2</sub>-aire a la entrada del reactor: 0.8 vvm (2 L min<sup>-1</sup>) y 0.4 vvm (1 L min<sup>-1</sup>), la concentración de CO<sub>2</sub>: 5 y 10 % v/v, y la intensidad de luz: 3260 y 5620 Lx, los resultados se reporta en el anexo 2D.

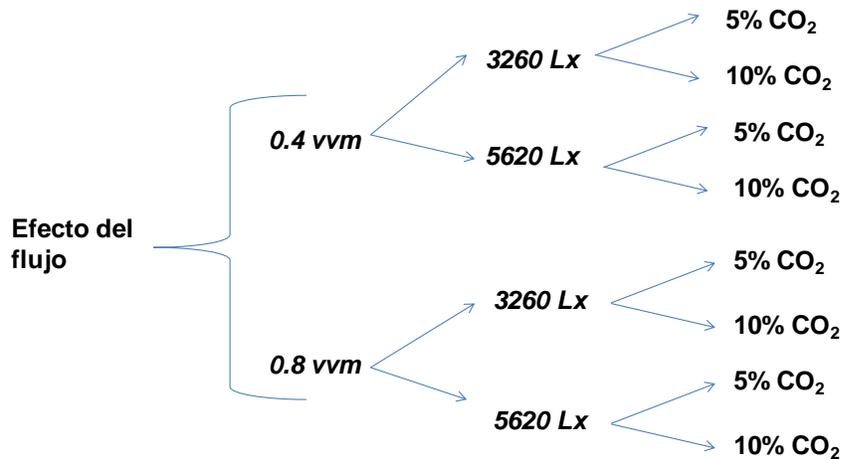


Figura 26. Diseño factorial, para determinar el efecto del flujo, la intensidad de luz, el suministro de CO<sub>2</sub> y su interacción.

En la figura 27 muestra la curva de crecimiento y capacidad de captura de CO<sub>2</sub> a 5620 Lx y 5% de CO<sub>2</sub>, la mayor captura de CO<sub>2</sub> se logró con un flujo de 0.8 vvm, alcanzando un máximo de 16.7 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Para 0.4 vvm se tuvo un máximo de 8.2 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, además se observó un aumento en la concentración de biomasa, para 0.8 vvm. La biomasa máxima cuantificada fue de 3.8 Kg m<sup>-3</sup> y 3.1 Kg m<sup>-3</sup> para 0.8 y 0.4 vvm, respectivamente. Asimismo las tasas de crecimiento específico aumentaron 2.3 veces al incrementar el flujo, teniendo 0.51 d<sup>-1</sup> para 0.8 vvm y 0.22 d<sup>-1</sup> para 0.4 vvm.

En el caso del experimento con alimentación del 10% de CO<sub>2</sub> (figura 28), se obtuvo un máximo de captura de 51.2 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> en 0.8 vvm y de 21.8 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> para 0.4 vvm, de igual forma las mayores tasas de crecimiento ocurrieron en 0.8 vvm con un valor de 0.69 d<sup>-1</sup>, en comparación de 0.33 d<sup>-1</sup> obtenido con un flujo de 0.4 vvm. También la biomasa producida en el reactor fue mayor a 0.8 vvm (3.8 Kg m<sup>-3</sup>).

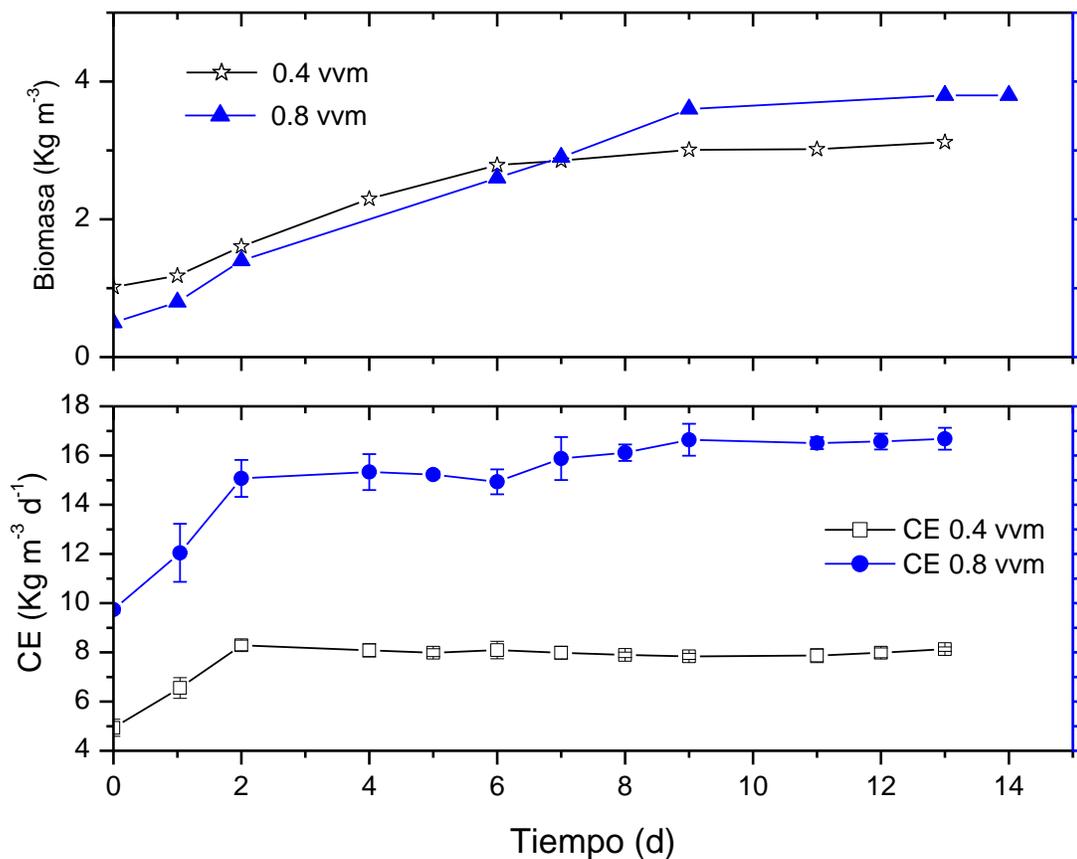


Figura 27. Evolución de la biomasa suspendida en peso seco y capacidades de captura de CO<sub>2</sub>, suministrando 5% de CO<sub>2</sub> v/v a 5620 Lx con 0.4 y 0.8 vvm.

El máximo porcentaje de remoción de CO<sub>2</sub> obtenido fue de 25 % con un suministro del 10 % v/v con una  $\mu_{\max}$  de 0.69 d<sup>-1</sup>, una  $X_{\max}$  de 3.8 Kg m<sup>-3</sup> y una  $P_{\max}$  de 0.45 Kg m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>(figura 28). de Morais y Costa (2007a) reportaron que en el cultivo de *Scenedesmus obliquus* con 12% de CO<sub>2</sub> v/v usando un fotobiorreactor tubular con volumen de operación de 1.9 L se obtuvo un %R<sub>max</sub> de 28%, con una  $\mu_{\max}$  de 0.33 d<sup>-1</sup>, una  $X_{\max}$  de 3.38 Kg m<sup>-3</sup> y una  $P_{\max}$  de 0.17 Kg m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup>. Al comparar estos datos con los obtenidos en este estudio, se observa que aunque el porcentaje de remoción es menor, los parámetros cinéticos obtenidos con *Ourococcus* sp., fueron mayores a los reportados para la microalga *S. obliquus*, sin embargo hay que considerar que ésta fue cultivada en tres FBRR conectados en serie, lo cual incrementa el tiempo de residencia del CO<sub>2</sub> y con ello la remoción del contaminante.

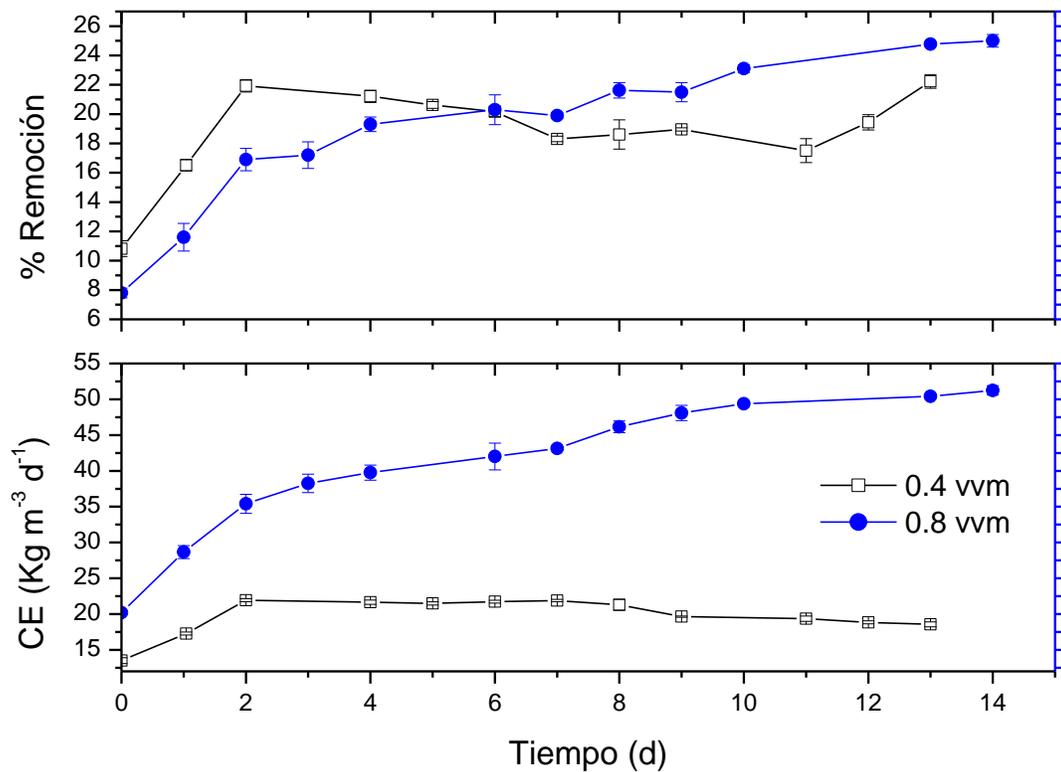


Figura 28. Capacidades de captura de CO<sub>2</sub> y porcentajes de remoción suministrando 10% de CO<sub>2</sub> v/v a 5620 Lx con 0.4 y 0.8 vvm.

Los parámetros de los experimentos se resumen en las tablas 10 y 11, mientras que los intervalos de confianza se reportan en el anexo 2B

Tabla 10. Parámetros obtenidos a 0.4 y 0.8 vvm con suministros del 5 y 10% de CO<sub>2</sub> v/v a 5620 Lx.

Parámetros	5620 Lx			
	5 % CO <sub>2</sub>		10 % CO <sub>2</sub>	
	0.4 vvm	0.8 vvm	0.4 vvm	0.8 vvm
<b>X<sub>max</sub></b>	3.12	3.80	2.69	3.80
<b>P<sub>max</sub></b>	0.32	0.45	0.30	0.45
<b>μ<sub>max</sub></b>	0.22	0.51	0.33	0.69
<b>P<sub>CO2</sub></b>	0.60	0.85	0.57	0.85
<b>CE<sub>max</sub></b> (Kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	8.28	16.74	21.92	51.24
<b>%Rco2<sub>max</sub></b>	14.2	12.62	22.23	25.02

ANOVA Pvalue < 0.0001.

Tabla 11. Parámetros obtenidos a 0.4 y 0.8 vvm con suministros del 5 y 10 % de CO<sub>2</sub> v/v a 3260 Lx.

<b>3260 Lx</b>				
Parámetros	5 % CO <sub>2</sub>		10 % CO <sub>2</sub>	
	0.4 vvm	0.8 vvm	0.4 vvm	0.8 vvm
<b>X<sub>max</sub></b>	3.37	3.55	3.10	2.57
<b>P<sub>max</sub></b>	0.25	0.32	0.26	0.16
<b>μ<sub>max</sub></b>	0.18	0.38	0.18	0.44
<b>P<sub>CO2</sub></b>	0.47	0.61	0.49	0.30
<b>CE<sub>max</sub></b> (Kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	9.1	13.52	20.48	21.98
<b>%R<sub>CO2max</sub></b>	12.87	14.44	19.27	10.80

ANOVA Pvalue &lt; 0.0001.

Con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para la interacción de los factores (anexo 2E), se comprobó que, la máxima concentración de biomasa y productividad se obtuvo con un flujo de 0.8 vvm a 5620 Lx al 5 o 10% de CO<sub>2</sub>.

Para el caso de la tasa de crecimiento específico y la capacidad de captura de CO<sub>2</sub>, no se pudo corroborar la homogeneidad de varianzas (anexo 2C), y como se mencionó anteriormente, al corroborarse la distribución normal de los errores (anexo 2A), se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, la cual nos mostró que la  $\mu_{\max}$  se incrementó al suministrar mayor flujo, mayor concentración de CO<sub>2</sub> o mayor intensidad de luz, sin haber diferencias significativas cuando se trabajó con 3260 Lx al 5 o 10 % de CO<sub>2</sub>. La capacidad de captura de CO<sub>2</sub> en el sistema fue estadísticamente igual cuando se suministró 10% de CO<sub>2</sub> a 0.4 vvm con 3260 o 5620 Lx y a 0.8 vvm con 3260 Lx. La mayor captura se obtuvo al 10% de CO<sub>2</sub> con 5620 Lx y 0.8 vvm. De la misma forma la máxima captura de CO<sub>2</sub> al suministrar 5% de CO<sub>2</sub> se obtuvo con 5620 Lx y 0.8 vvm, además la máxima fijación de CO<sub>2</sub> en biomasa también se obtuvo con el mismo tratamiento.

Los porcentajes de remoción cuando se trabajó al 5% de CO<sub>2</sub> fueron estadísticamente iguales sin importar el flujo o intensidad de luz suministrada, sin

embargo cuando se proveyó 10% de CO<sub>2</sub>, el porcentaje de remoción se incrementó con forme se aumentó la intensidad de luz y el flujo, registrándose el máximo a 5620 Lx y 0.8 vvm.

En la tabla 12 se resumen, las tasas de fijación de CO<sub>2</sub> con respecto a la biomasa y la productividad, de algunas especies de microalgas utilizadas en la remoción de CO<sub>2</sub> en corrientes gaseosas. Comparando los resultados de este estudio, vemos que *Ourococcus* sp. tuvo mayor capacidad para fijar CO<sub>2</sub> en forma de biomasa, y que su productividad le permitió obtener la mayor cantidad de biomasa respecto a otras especies de microalgas.

Tabla 12. Tasas de fijación de CO<sub>2</sub> y productividad de biomasa de distintas microalgas (Wang *et al.*, 2008).

Microalga	%CO <sub>2</sub>	P <sub>max</sub> (Kg m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	PCO <sub>2</sub> (Kg CO <sub>2</sub> *m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	Referencia
<i>Chlorella kessleri</i> Fott <i>et</i> Nováková.	18	0.087	0.163*	de Morais y Costa, 2007c.
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijerinck.	aire	0.04	0.075*	Scragg <i>et al.</i> , 2002.
<i>Haematococcus</i> sp.	16-34	0.076	0.143	Huntley y Redalje, 2007.
<i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kützing.	18	0.14	0.26	de Morais y Costa, 2007a.
<i>Spirulina</i> sp.	12	0.22	0.413*	de Morais y Costa, 2007a.
<i>Ourococcus</i> sp.	5	0.505	0.95*	Este estudio.
<i>Ourococcus</i> sp.	10	0.517	0.92*	Este estudio.

\*Valores calculados a partir de la productividad de biomasa (P) de acuerdo a la ecuación

$$P_{CO_2} = C_c * \left( \frac{M_{CO_2}}{M_c} \right) (P) = 1.88 * (P).$$

## 6.5 Efecto de la carga y concentración de CO<sub>2</sub>.

Estudios previos han demostrado que las microalgas pertenecientes a la división Chlorophyta son capaces de crecer bajo altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (≤50%)

(Skjanes *et al.*, 2007), sin embargo es necesario considerar que en el cultivo de microalgas no es recomendable suministrar CO<sub>2</sub> por arriba de la concentración que causa inhibición, o por debajo del valor que limita el crecimiento y que tal concentración máxima (inhibición) y mínima (limitación) varía de una especie a otra.

Analizando el efecto de la carga de CO<sub>2</sub> suministrada sobre la capacidad de captura de *Ourococcus* sp. observamos que al incrementar la carga (figura 29), se obtuvo mayor captura del CO<sub>2</sub>, con valores de  $111.9 \pm 8.5 \text{ Kg m}^{-3}$  y  $220.7 \pm 28 \text{ Kg m}^{-3}$  para 40 y 80  $\text{Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente.

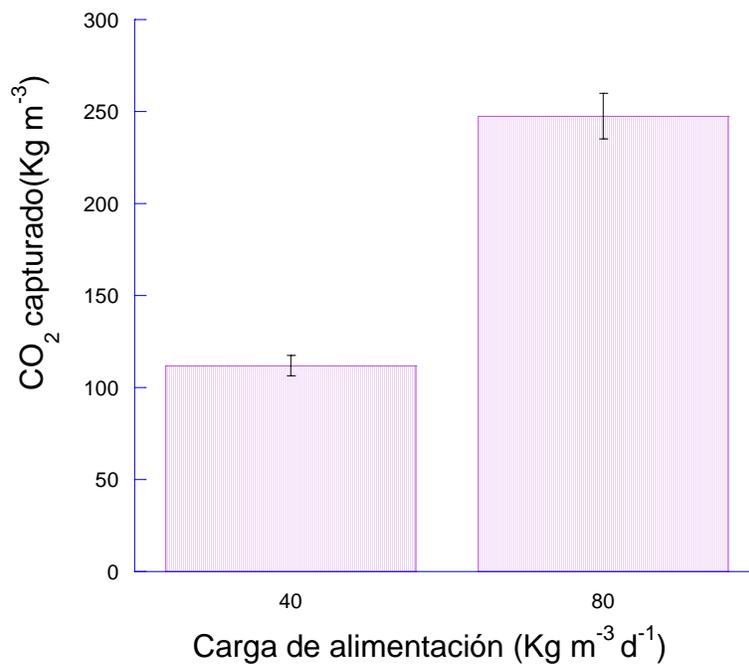


Figura 29. Cantidad de CO<sub>2</sub> capturado total a los 13 días de cultivo con una alimentación de 40 y 80  $\text{Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

Al suministrar la mismas cargas ( $80 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) se observó que con la mezcla al 10% de CO<sub>2</sub> y un flujo de 0.4 vvm se capturó en promedio una mayor cantidad de CO<sub>2</sub> ( $261.3 \pm 6.5 \text{ Kg m}^{-3}$ ), que lo obtenido con 5% a un flujo de 0.8 vvm ( $206.33 \pm 6.94 \text{ Kg m}^{-3}$ ).

m<sup>-3</sup>), pero sin tener un incremento significativo en la biomasa producida, ya que en ambos casos se registró una biomasa promedio total de 3 Kg m<sup>-3</sup>.

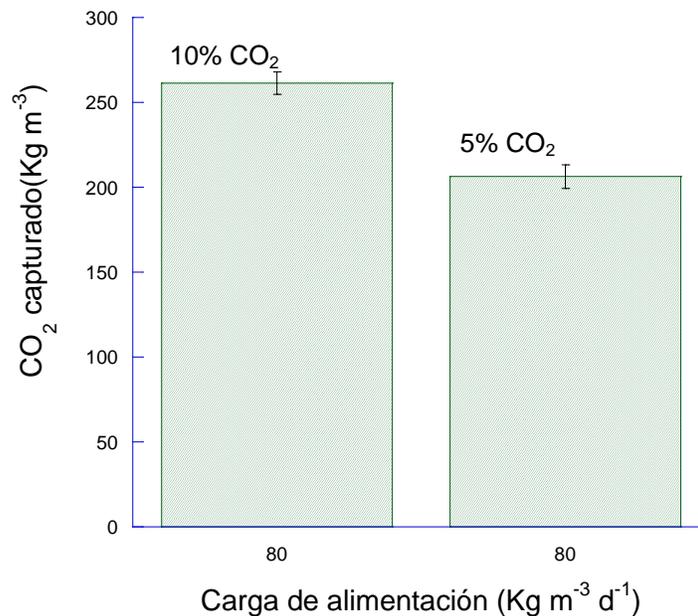


Figura 30. Cantidad de CO<sub>2</sub> capturado total a los 13 días de cultivo con una alimentación constante de 80 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, obtenida con 5 y 10 % CO<sub>2</sub>.

En estos experimentos no se observó inhibición por la cantidad de CO<sub>2</sub> suministrado, *Ourococcus* sp. crece adecuadamente con corrientes gaseosas enriquecidas al 10% y con cargas de CO<sub>2</sub> de hasta 160 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, como fue el caso del experimento realizado con un flujo de 0.8 vvm.

## 6.6 Contenido de aceites.

Para conocer la capacidad de *Ourococcus* sp. para acumular aceites se realizaron extracciones en la biomasa obtenida en los experimentos anteriores y se determinó que la microalga contiene entre 20-30% de aceites en relación a su peso seco, lo cual concuerda con lo reportado para otra especie de *Ourococcus* (27%) (Shifrin y Chisholm, 1981). Por otro lado, si se compara este valor con el reportado para otras

especies de microalgas utilizadas en la obtención de aceites (tabla 13), se observa que se encuentra en el límite inferior, sin embargo hay que tomar en cuenta que fue cultivada bajo condiciones favorables de nutrientes y que es posible incrementar este valor, ya que diversos autores han reportado que esto sucede bajo limitación de nutrientes. Además Shifrin y Chisholm (1981) reportaron que bajo condiciones de limitación de nitrógeno una especie de *Ourococcus* aumentó su contenido de aceites de 27% a 49.5 %. Sin embargo hay que considerar que las microalgas cultivadas bajo diferentes condiciones de iluminación pueden asimilar el CO<sub>2</sub> y dirigirlo hacia diferentes rutas metabólicas, por ejemplo, hacia la formación de aminoácidos y constituyentes esenciales de la célula cuando se encuentran bajo condiciones de luz limitantes y en contraste hacia la formación de azúcares y almidones bajo condiciones saturadas de luz (Jacob-Lopes *et al.*, 2009b).

Un proceso ideal para la producción de aceites, requiere de una alta productividad de biomasa y alto contenido de lípidos, desafortunadamente esto no siempre es factible, porque el incremento en el contenido de aceites es generado usualmente por estrés nutricional, que a su vez está asociado con la disminución en la productividad de biomasa. Aunado a esto, la capacidad de acumular importantes cantidades de aceites bajo condiciones de cultivo favorables, solo se ha observado en algunas especies de microalgas, (*Chlorella* spp., *Dunaliella* spp., *Nannochloris* sp., *Parietochloris incisa* (H. Reising) S. Watanabe, *Neochloris oleoabundans* S. Chantanachat *et* H.C. Bold y *Botryococcus braunii* Kützing). Por lo anterior recientemente ha surgido interés en el desarrollo de tecnologías que permitan incrementar el contenido de aceites en especies con bajo contenido de aceites y altas tasas de crecimiento, sin afectar significativamente la productividad de biomasa. Con lo anterior se podría reducir los costos de obtención de aceites que pudieran ser utilizados en la producción de biodiesel. La idea de utilizar microalgas como fuente de aceites no es nueva, pero sí de gran interés debido al aumento en los precios del petróleo, sus beneficios ambientales y el hecho de que es producido a partir de fuentes renovables (Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008a).

Por lo anterior se puede decir que la microalga *Ourococcus* sp. aislada en este estudio puede tener potencial para ser utilizada en la obtención de aceites, ya que tuvo una  $P_{\max}$  de  $0.5 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , con una concentración  $X_{\max}$  de  $6 \text{ Kg m}^{-3}$ , lo cual es mayor a lo reportado para una de las principales especies utilizadas en la producción de biodiesel, *Neochloris oleoabundans* que presenta una  $P_{\max}$  de  $0.63 \text{ Kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  y una  $X_{\max}$  de  $3.15 \text{ Kg m}^{-3}$  (Li *et al.*, 2008a).

Tabla 13. Porcentaje de aceites en las microalgas más utilizadas en la obtención de aceites, adaptada de Chisti, 2007.

Microalga	División	% Aceites en peso seco
<i>Botryococcus braunii</i> Kützing.	Chlorophyta	25–75
<i>Chlorella</i> sp.	Chlorophyta	28–32
<i>Nannochloris</i> sp.	Chlorophyta	20–35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Heterokontophyta	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i> S. Chantanachat et H.C. Bold.	Chlorophyta	35–54
<i>Nitzschia</i> sp.	Heterokontophyta	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> Bohlin.	Heterokontophyta	20–30

### 6.7 Balances de carbono y nitrógeno.

Se realizó un estudio de los compuestos orgánicos volátiles (COV) en el gas de salida del reactor, ya que se tienen reportes de que son ampliamente producidos en ambientes marinos. Estos compuestos están implicados en el deterioro de la capa de ozono, y su producción ha sido estudiada tanto en macroalgas como microalgas. McKay *et al* (1996) sugieren que el propano, propeno, etano y eteno se producen durante la autólisis del fitoplancton, posiblemente durante la oxidación de lípidos poliinsaturados liberados al medio de cultivo. Además afirman que el isopreno y el hexano, aparecen durante el crecimiento del fitoplancton y por tanto es más probable

que se produzcan directamente por el fitoplancton o a través de la oxidación del carbono orgánico disuelto.

Para determinar la cantidad de COV en el gas, se realizó una colecta del gas a la entrada y salida del reactor durante 12 h, en canisters de 6 L y se analizaron por cromatografía de gases siguiendo el método TO-14A de la EPA (Compendium Method TO-14A, 1999). Los compuestos encontrados en mayor proporción o concentración, se reportan en la tabla 14. La cantidad de carbono que se determinó en forma de COV fue de 37 mg del carbono suministrado.

Tabla 14. Compuestos orgánicos volátiles determinados.

<b>COV</b>	<b>ppb*</b>	<b>Proporción (entrada - salida / entrada)</b>
T-2-Penteno	0.241	2.25
1-Hexeno	0.774	1.67
3-Metilhexano	1.203	7.50
2-Metilheptano	0.064	0.97
Isopropilbenceno	0.086	0.77
2,2,4-Trimetilpentano	0.057	0.61
Metilciclohexano	0.186	0.64
o-Xileno	0.257	0.51
Propano	1.480	0.10
Popileno	2.325	0.16
C-2-Buteno	0.975	0.26
Acetileno	0.852	0.24
Isobutano	0.956	0.19
T-2-Penteno	0.241	2.25
1-Hexeno	0.774	1.67
3-Metilhexano	1.203	7.50
2-Metilheptano	0.064	0.97

ppb: partes por billón.

En la tabla 15 se presenta el balance de carbono para el experimento donde se obtuvo la mayor concentración de biomasa, tomando en cuenta la cantidad de carbono (C) en el medio de cultivo, el gas de salida del reactor y el contenido de carbono en la biomasa.

Tabla15. Balance de carbono para el experimento con un suministro de 8000 Lx y un flujo de 0.4 vvm.

	10% CO <sub>2</sub>	5% CO <sub>2</sub>
Biomasa total (g)	11.5	12
CO <sub>2</sub> total capturado (g)	647.5	278.2
Gramos de C en biomasa	5.9	6.2
Gramos de C capturados en el sistema	176.6	75.9
% C en biomasa*	3.63	8.96
% C en COV	0.02	0.05
% C en medio de cultivo	0.28	0.66
% C por error experimental en la mezcla**	15	15
<b>% Total</b>	<b>18.96</b>	<b>24.67</b>

\*Suma de la biomasa final y la retirada por mediciones.

\*\* Corroborado con una mezcla estándar al 10% CO<sub>2</sub>/aire (Praxair).

Estudios previos han mostrado que solo una pequeña fracción (~3%) del carbono capturado en los fotobiorreactores se recupera como biomasa, indicando la existencia de otras rutas de conversión de CO<sub>2</sub> (Jacob-Lopes *et al.*, 2009c), Por lo que es necesario continuar con las investigaciones, ya que no se logró cerrar el balance de carbono.

Se realizó un seguimiento de la cantidad de nitrógeno (N) disponible en el medio. El medio BG11 contiene 1.5 g L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>, lo que equivale a tener 0.247 g L<sup>-1</sup> de N. El consumo de N a lo largo de los 13 días de cultivo de la microalga *Ourococcus* sp. fue de 206 ppm y el nitrógeno residual en promedio fue de 43 ppm. Utilizando la fórmula molecular de la biomasa microalgal reportada por Chisti (2007),  $CO_{0.48}H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01}$ , se calculó la cantidad teórica de biomasa que podría formarse dando un valor de 3.1 g L<sup>-1</sup>, experimentalmente se cuantificó una producción de 3.5 g L<sup>-1</sup> y 3.4 g L<sup>-1</sup> para el 10 y 5% de CO<sub>2</sub> respectivamente. Por lo tanto las microalgas se encontraban bajo limitación de nitrógeno, lo cual pudo verse reflejado en la cantidad de biomasa recuperada, es posible que se estuvieran formando sustancias de reserva que no fueron cuantificadas.

## CAPITULO 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 7.1. Conclusiones.

El reactor de columna de burbujas fue el más adecuado para el cultivo de *Ourococcus* sp. ya que no promueve la formación de biopelículas.

El incremento en la intensidad de luz de 3260 a 8000 Lx, permitió aumentar al doble los parámetros cinéticos ( $X_{max}$ ,  $\mu_{max}$ ,  $P_{max}$ ) de *Ourococcus* sp. Además se observó que al trabajar con una intensidad luminosa de 8000 Lx y 5% de CO<sub>2</sub> se obtuvo la mayor concentración de biomasa (6 Kg m<sup>-3</sup>), pero también se generó una disminución en la capacidad de captura de CO<sub>2</sub> en el sistema.

Al incrementar el flujo de entrada a 0.8 vvm se indujo una mayor productividad y concentración de biomasa. La mayor fijación de CO<sub>2</sub> en biomasa, porcentaje de remoción y captura de CO<sub>2</sub> se logró al 10% con 5620 Lx y un flujo de 0.8 vvm.

En estos experimentos no se observó inhibición por la cantidad de CO<sub>2</sub> suministrado hasta el 10%, *Ourococcus* sp. creció con corrientes gaseosas con cargas de CO<sub>2</sub> de hasta 160 Kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, por lo que es una especie con potencial para la captura del CO<sub>2</sub> producido por los gases de combustión en las estaciones termoeléctricas, sin embargo operar con corrientes gaseosas altamente enriquecidas resultaría en una pérdida considerable del contaminante ya que los porcentajes de remoción del CO<sub>2</sub> resultaron bajas (25 %).

*Ourococcus* sp. puede tener un potencial biotecnológico para la obtención de aceites ya que en este estudio, se observó que es capaz de almacenar un 20-30% de su peso seco en forma de aceites.

## 7.2. Perspectivas.

Estudios recientes han demostrado que el uso de microalgas como alternativa para disminuir las concentraciones de CO<sub>2</sub>, sólo puede ser económicamente factible, si se aprovecha la biomasa para la obtención de un producto de valor agregado. Por lo tanto, es necesario realizar un estudio fisiológico (perfil de ácidos grasos, pigmentos), de la microalga aislada, ya que los parámetros cinéticos de *Ourococcus* sp. son superiores a una de las principales microalgas reportadas como almacenadoras de aceites (*Neochloris oleoabundans*). Además la microalga estudiada no fue cultivada en condiciones de estrés, por lo que en tales condiciones el contenido de aceites podría incrementarse significativamente, por ejemplo bajo limitación por nitrógeno (Khozin-Goldberg, 2002; Spolaore *et al.*, 2006; Solovchenko *et al.*, 2007). Particularmente, es de sumo interés realizar estudios limitando el fósforo durante el crecimiento, ya que *Ourococcus* sp. proviene de una laguna donde en condiciones naturales crece en carencia de este elemento. El desarrollo de la cepa en condiciones de estrés y/o limitación de nutrientes, puede contribuir en el desarrollo de procesos para la obtención de metabolitos de valor agregado. Aunado a lo anterior, con el fin de obtener mayores concentraciones de biomasa, es necesario evaluar si *Ourococcus* sp. puede crecer en condiciones de heterotrofia y mixotrofia (Shia *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2003; Miao y Wu., 2006).

La utilización de microalgas para la captura de CO<sub>2</sub>, resulta en una buena opción para mitigar las concentraciones atmosféricas o las emisiones de las industrias relacionadas con la obtención de energía, sin embargo el balance de carbono, aun es un tema que no se ha aclarado, ya que la cantidad removida y recuperada como biomasa no concuerdan, en ningún estudio. Por otro lado, debido a que el máximo porcentaje de remoción de CO<sub>2</sub> fue del 25 %, se plantea la utilización de reactores en serie para aprovechar el gas de salida de un reactor, como influente en el siguiente.

Tomando en cuenta que las microalgas pueden excretar una variedad de biomoléculas (carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, enzimas, entre otros) y que existen reportes de que son capaces de excretar compuestos carbonilos, como los aldehídos tanto en ambientes marinos como en sistemas de agua dulce, una línea importante de investigación podría ser la determinación de la producción de formaldehído. Nuccio y Kieber (1995) observaron la producción de este compuesto en ambientes marinos cuando la concentración de clorofila *a* permanecía relativamente baja, y conforme las microalgas pasaban a la fase exponencial de crecimiento, las concentraciones de formaldehído disminuían, lo que indicaba una posible utilización biológica. Por otro lado se reporta en la literatura que varias microalgas son capaces de producir aldehídos de alto peso molecular como por ejemplo pentanal, hexanal y decanal (Jüttner, 1984). Además, se ha reportado que la microalga *Chlamydomonas globosa* J.W. Snow libera formaldehído, acetaldehído, acetona, n-heptano y valeraldehído (Collins y Bean, 1963).

---

## CAPITULO 8. REFERENCIAS.

- Acién FF., Fernández SJ., Sánchez PJ., Molina GE., Chisti Y. 2001. Airlift-driven external loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. *Chem. Eng. Sci.* 56:2721-2732.
- Aresta M., Dibenedetto A., Barberio G. 2005. Utilization of macro-algae for enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study. *Fuel Process Technol.* 86:1679-1693.
- Borowitzka MA. 1992. Algal biotechnology products and processes-matching science and economics. *J Appl Phycol.* 4:267-279.
- Borowitzka MA. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol.* 70:313-321
- Bourelly P. 1985. Les Algues D'eau Douce, Initiation à la systématique. Tome 1-A. Les Algues Vertes. Éditions N. Boubée & Cie. Pag. 225-228.
- Caraco NF, Miller R. 1998. Effect of CO<sub>2</sub> on competition between a cyanobacterium and eukaryotic phytoplankton. *Can. J. Aquat. Sci.* 55:54-62.
- Camacho RF., Acién FF., Sánchez PJ., García CF., Molina GE. 1999. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnol. Bioeng.* 62:71-86.
- Carvalho AP., Meireles LA., Malcata FX. 2006. Microalgal Reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 22:1490-1506.
- Cheng L., Zhang L., Chen H., Gao C. 2005. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Sep Purif Technol.* doi:10.1016/j.seppur.2005.12.006
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294–306.
- Compendium Method TO-14A. 1999. Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air. Second Edition. Determination Of Volatile Organic Compounds (VOCs) In Ambient Air Using Specially Prepared Canisters With Subsequent Analysis By Gas Chromatography. Center for Environmental Research Information. U.S. EPA. <http://www.epa.gov/ttnamti1/files/ambient/airtox/to-14ar.pdf>

- 
- Contreras FC., Peña CJ., Flores CL., Cañizares VR. 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. 28:(8) 450-456
- Collins R., Bean G. 1963. Volatile constituents obtained from *Clamydomonas globosa*, the carbonyl fraction. *Phycology*. 3: 55-59.
- Dawes C. 1991. Botánica marina. Ed. Limusa. México
- de Morais MG., Costa JAV. 2007a. Biofixation of carbon dioxide fixation by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in three-stage serial tubular photobioreactor. *J Biotechnol*. 129:439-445.
- de Morais MG., Costa JAV. 2007b. Carbon dioxide fixation by *Clorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. Cultivated in flask and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnol Lett*. 29:1349-1352.
- de Morais MG., Costa JAV. 2007c. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Convers Manag*. 48:2169-2173
- Divakaran R., Sivasankara PVN. 2002. Flocculation of algae using chitosan. *J Appl Phycol*. 14:419-422.
- Doran PM. 1998. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Ed. Acribia, S.A. España.
- Duarte CM. 2006. Cambio global, Impacto de la actividad humana sobre el sistema Tierra. Colección divulgación. CSIC, Madrid.
- Evans GM., Furlong JC. 2003. Environmental Biotechnology: Theory and Application. John Wiley and Sons, Ltd. England.
- Falcón LI., Cerritos R., Eguiarte LE., Souza V. 2007. Nitrogen Fixation in Microbial Mat and Stromatolite Communities from Cuatro Ciénegas, Mexico. *Microb Ecol*. 54:363-373. doi: 10.1007/s00248-007-9240-3
- García-Malea LMC., Del Río SE., Casas LJL., Ación FFG., Fernández SJM., Rivas J., Guerrero MG., Molina GE. 2006. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *J. Biotechnol*. 123:329-342.
- Graham LE., Wilcox LW. 2000. Algae. Prentice Hall Inc. USA.

- 
- Huntley ME., Redalje DG. 2007. CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitig Adapt Strategies Glob Chang*. 12:573-608
- IPCC. 2005. Informe especial: La captación y almacenamiento de dióxido de carbono. [http://www.ipcc.ch/pdf/special-reports/srccs/srccs\\_spm\\_ts\\_sp.pdf](http://www.ipcc.ch/pdf/special-reports/srccs/srccs_spm_ts_sp.pdf).
- Jacob-Lopes E., Revah S., Hernández S., Shirai K., Teixeira FT. 2009a. Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors. *Chem. Eng. J.* doi:10.1016/j.cej.2009.06.025
- Jacob-Lopes E., Gimenes SC., Lacerda FL, Teixeira FT. 2009b. Effect of light cycles (night/day) on CO<sub>2</sub> fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chem Eng Process*. 48:(1) 306-310.
- Jacob-Lopes E., Gimenes SC., Queiroz MI., Teixeira FT. 2009c. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. *New Biotechnology*. 25:(1) s279. doi:10.1016/j.nbt.2009.06.631
- Johansen BE. 2008. Global warming 101. Greenwood Press. USA
- Jüttner F. 1984 Dynamics of the Volatile Organic Substances Associated with Cyanobacteria and Algae in a Eutrophic Shallow Lake. *Appl Environ Microb*. 47:(4) 814-820.
- Khozin-Goldberg I. 2002. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incise* (Trebuxiophyceae). *J. Phycol.* 38:991-994.
- Lara MA., Moreno JL., Amaro E.J. 1996. Fitoplancton: Conceptos básicos y técnicas de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.
- Lee RE. 1999. Phycology. 3 ed. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Li X., Xu H., Wu Q. 2007. Large-Scale Biodiesel Production From Microalga *Chlorella protothecoides* Through Heterotrophic Cultivation in Bioreactors. *Biotechnol Bioeng*. 98:(4) 764-771
- Li Y., Horsman M., Wang B., Wu N. 2008a. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol*. Doi 10.1007/s00253-008-1681-1

- 
- Li Y., Horsman M., Wu N., Lan CQ., Dubois-Calero N. 2008b. Biofuels from microalgae. *Biotech Prog* (in press) ASAP Article, doi 10.1021/bp070371kS8756-7938(07)00371-2
- Martínez J., Fernández BA. 2004. Cambio climático una visión desde México. INE-SEMARNAT. México.
- Mathews C., van Holde K. 2005. Bioquímica. 3a edición. Ed. Pearson. España.
- McKay WA., Turner MF., Jones BMR. 1996. Emissions of hydrocarbons from marine phytoplankton—some results from controlled laboratory experiments. *Atmos Environ.* 30:(14) 2583-2593.
- Miao X., Wu Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technol.* 97:841-846.
- Moroney J., Somanchi A. 1999. How Do Algae Concentrate CO<sub>2</sub> to Increase the Efficiency of Photosynthetic Carbon Fixation. *Plant. Physiol.* 119:9-16
- Molina GE., Fernández J., Acién FG., Chisti Y. 2001. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J. Biotechnol.* 92:113-131.
- Molina GE., Belarbi EH., Acién FFG., Robles MA., Chisti Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv.* 20:491-515.
- Nuccio J., Seaton OJ., Kieber RJ. 1995. Biological production of formaldehyde in the marine environment. *Limnol Oceanogr.* 40:(3) 521-527.
- Pulz O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57:287-293.
- Pulz O., Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65:635-648.
- Ramanathan V., Feng Y. 2009. Air pollution, greenhouse gases and climate change: Global and regional perspectives. *Atmos Environ.* 43:37-50.
- Rasmussen M. 2009. Methane Emissions and Ruminants. *Microbe (Letters).* 10(4):437.
- Rocha JMS., Garcia JEC., Henriques MHF. 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomol Eng.* 20:237-242.

- 
- Rodríguez-Almaraz GA., González-Aguilar JA., Mendoza-Alfaro R. 1997. Biological and Ecological Notes of *Palaemonetes suttkusi* (Crustacea: Palaemonidae) from Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, México: *Southwest Nat.* 42:(4) 501-503.
- Sánchez MA., García CF., Contreras GA., Molina GE., Chisti Y. 2000. Bubble column and airlif photobioreactors for algal culture. *Aiche J.* 46:(9) 1872-1887.
- Sánchez MA., Cerón GM., García CF., Molina GE., Chisti Y. 2002. Grow and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme Microb Technol.* 31:1015-1023.
- Scragg AH., Illman AM., Carden A., Shales SW. 2002. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass Bioenergy.* 23:67-73
- Shia. X-M., Zhangb X-W., Chenb F. 2000. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microb Technol.* 27:312-318
- Shifrin NS., Chisholm SW. 1981. Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J Phycol.* 17:374-384.
- Skjanes K., Lindblad P., Muller J. 2007. BioCO<sub>2</sub> – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO<sub>2</sub> while producing H<sub>2</sub> and high value products. *Biomol Eng.* 24: 405-413.
- Solovchenko AE., Khozin-Goldberg I., Didi-Cohen S., Cohen Z., Merzlyak MN. 2007. Effects of light intensity and nitrogen starvation on grow, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incise*. *J Appl Phycol.* doi 10.1007/s10811-007-9233-0
- Souza V., Escalante A., Espinoza L., Valera A., 2004. CUATRO CIÉNEGAS: Un laboratorio natural de astrobiología. CIENCIAS 67. Julio-septiembre 2004.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng.* 101:87-96.
- Su CH, Giridhar R, Chen CW, Wu WT. 2006. A novel approach for medium formulation for growth of a microalga using motile intensity. *Bioresource Technol.* 98:3012–3016.

- Ugwu CU., Aoyagi H., Uchiyama H. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technol.* 99:4021-4028.
- Wang B., Li Y., Wu N., Lan Q. 2008. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 79:707-718.
- Zevenhoven R., Eloneva S., Teir S. 2006. Chemical fixation of CO<sub>2</sub> in carbonates: Routes to valuable products and long-term storage. *Catal Today.* 115:73-79.
- Zhang K., Kurano N., Miyachi S. 2002. Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng.* 25:97-101. doi 10.1007/s00449-002-0284-y

## ANEXOS.

### 1. Pruebas estadísticas para la intensidad de luz suministrando 5 y 10% CO<sub>2</sub>.

Las hipótesis a probar fueron las siguientes:

*Ho: las medias de los parámetros medidos a las tres intensidades de luz son iguales*

*Ha: al menos una media es diferente.*

*Ho: medias de los parámetros medidos con los 2 suministros de CO<sub>2</sub> son iguales*

*Ha: al menos una media es diferente.*

*Ho: No hay efecto en la interacción de la intensidad de luz y la concentración de CO<sub>2</sub>.*

*Ha: Sí hay efecto en la interacción de la intensidad de luz y la concentración de CO<sub>2</sub>.*

El modelo 3x2 es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \tau\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:  $Y_{ijk}$ , es el parámetro medido en la k-esima repetición, al que se le aplicó la i-esima intensidad de luz, la j-esima concentración de CO<sub>2</sub>,  $\mu$  es la media general del parámetro medido,  $\tau_i$  es el efecto de la i-esima intensidad de luz sobre el parámetro medido,  $\beta_j$  es el efecto de la j-esima concentración de CO<sub>2</sub> sobre el parámetro medido,  $\tau\beta_{ij}$  es el efecto de la interacción de la intensidad de luz  $i$  y la concentración de CO<sub>2</sub>  $j$ ,  $\varepsilon_{ijk}$  es el error asociado a la observación  $Y_{ijk}$ .

Los parámetros medidos fueron: biomasa máxima, productividad máxima, tasa máxima de crecimiento específico, tasa de fijación de CO<sub>2</sub>, capacidad de captura de CO<sub>2</sub>, porcentaje de remoción de CO<sub>2</sub>.

Los niveles probados para la intensidad de luz fueron: 3260, 5620 y 8000 Lx y para la concentración de CO<sub>2</sub> fueron: 5 y 10 %.

A) Normalidad de los errores.

- Analizado con NCSS (Number Cruncher Statistical Systems,2007).

Biomasa maxima

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Shapiro-Wilk W	0.9381081	0.2688977			Can't reject normality

Productividad maxima

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Shapiro-Wilk W	0.7172635	1.276713E-04			Can't reject normality

Tasa máxima de crecimiento específico

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Martinez-Iglewicz	0		1.23901	1.407478	Can't reject normality

Tasa de fijación de CO<sub>2</sub>.

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Martinez-Iglewicz	0		1.23901	1.407478	Can't reject normality

Capacidad de captura CO<sub>2</sub>.

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Shapiro-Wilk W	0.9428114	0.3234932			Can't reject normality

Porcentaje de remoción de CO<sub>2</sub>.

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Shapiro-Wilk W	0.9403014	0.2932442			Can't reject normality

**B) Estadísticos descriptivos.**

Analizado con SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Versión 11).

**Descriptivos**

Biomasa máxima (g/L)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
3260, 5%	3	3.3775	.03377	.01950	3.2936	3.4614	3.34	3.41
5620, 5%	3	3.1200	.03120	.01801	3.0425	3.1975	3.09	3.15
8000, 5%	3	6.0000	.06000	.03464	5.8510	6.1490	5.94	6.06
3260, 10%	3	3.1000	.03000	.01732	3.0255	3.1745	3.07	3.13
5620, 10%	3	2.6933	.02517	.01453	2.6308	2.7558	2.67	2.72
8000, 10%	3	5.6600	.06000	.03464	5.5110	5.8090	5.60	5.72
Total	18	3.9918	1.35744	.31995	3.3168	4.6668	2.67	6.06

**Descriptivos**

Productividad biomasa (g/L\*d)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
3260, 5%	3	.2512	.00251	.00145	.2450	.2574	.25	.25
5620, 5%	3	.3200	.00320	.00185	.3121	.3279	.32	.32
8000, 5%	3	.5046	.00505	.00291	.4921	.5172	.50	.51
3260, 10%	3	.2633	.00577	.00333	.2490	.2777	.26	.27
5620, 10%	3	.3067	.00577	.00333	.2923	.3210	.30	.31
8000, 10%	3	.5167	.00577	.00333	.5023	.5310	.51	.52
Total	18	.3604	.11208	.02642	.3047	.4161	.25	.52

**Descriptivos**

Mu (d-1)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
3260, 5%	3	.1834	.00000	.00000	.1834	.1834	.18	.18
5620, 5%	3	.2287	.00000	.00000	.2287	.2287	.23	.23
8000, 5%	3	.3722	.00000	.00000	.3722	.3722	.37	.37
3260, 10%	3	.1833	.02309	.01333	.1260	.2407	.17	.21
5620, 10%	3	.3400	.00000	.00000	.3400	.3400	.34	.34
8000, 10%	3	.3800	.00000	.00000	.3800	.3800	.38	.38
Total	18	.2813	.08787	.02071	.2376	.3250	.17	.38

## Descriptivos

Tasa de fijación de CO<sub>2</sub> (g/L\*d)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
3260, 5%	3	.4722	.00472	.00273	.4605	.4840	.47	.48
5620, 5%	3	.6016	.00602	.00347	.5867	.6165	.60	.61
8000, 5%	3	.9487	.00949	.00548	.9251	.9723	.94	.96
3260, 10%	3	.4933	.00577	.00333	.4790	.5077	.49	.50
5620, 10%	3	.5733	.00577	.00333	.5590	.5877	.57	.58
8000, 10%	3	.9700	.01000	.00577	.9452	.9948	.96	.98
Total	18	.6765	.21087	.04970	.5717	.7814	.47	.98

## Descriptivos

Capacidad de captura (g/L\*d)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
3260, 5%	3	9.1097	.27739	.16015	8.4206	9.7987	8.85	9.40
5620, 5%	3	8.2827	.21529	.12430	7.7479	8.8175	8.07	8.50
8000, 5%	3	9.8077	.11224	.06480	9.5289	10.0865	9.73	9.94
3260, 10%	3	20.4833	.27502	.15878	19.8002	21.1665	20.21	20.76
5620, 10%	3	21.9233	.21197	.12238	21.3968	22.4499	21.73	22.15
8000, 10%	3	23.0300	.09000	.05196	22.8064	23.2536	22.94	23.12
Total	18	15.4394	6.61918	1.56016	12.1478	18.7311	8.07	23.12

## Descriptivos

Porcentaje de remoción (%)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
3260, 5%	3	12.8722	.64037	.36972	11.2815	14.4630	12.26	13.53
5620, 5%	3	14.2015	.79259	.45760	12.2325	16.1704	13.46	15.04
8000, 5%	3	14.4492	.82491	.47626	12.4000	16.4984	13.86	15.39
3260, 10%	3	19.2700	.86000	.49652	17.1336	21.4064	18.41	20.13
5620, 10%	3	22.2333	.46501	.26847	21.0782	23.3885	21.77	22.70
8000, 10%	3	21.1833	.16503	.09528	20.7734	21.5933	21.02	21.35
Total	18	17.3683	3.81341	.89883	15.4719	19.2646	12.26	22.70

### C) Homogeneidad de varianzas.

Analizado con SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Versión 11).

#### Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error

Variable dependiente: Biomasa máxima (g/L)

F	gl1	gl2	Significación
.536	5	12	.746

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intercept+LUZ \* CO2+LUZ+CO2

#### Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error

Variable dependiente: Productividad biomasa (g/L\*d)

F	gl1	gl2	Significación
1.126	5	12	.398

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intercept+LUZ \* CO2+LUZ+CO2

#### Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error

Variable dependiente: Mu (d-1)

F	gl1	gl2	Significación
16.000	5	12	.000

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intercept+LUZ \* CO2+LUZ+CO2

#### Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error

Variable dependiente: Tasa de fijación de CO2 (g/L\*d)

F	gl1	gl2	Significación
.375	5	12	.856

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intercept+LUZ \* CO2+LUZ+CO2

**Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error**

Variable dependiente: Capacidad de captura (g/L\*d)

F	gl1	gl2	Significación
.675	5	12	.650

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intercept+LUZ \* CO2+LUZ+CO2

**Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error**

Variable dependiente: Porcentaje de remoción (%)

F	gl1	gl2	Significación
.992	5	12	.462

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intercept+LUZ \* CO2+LUZ+CO2

**D) Análisis de varianza.**

Analizado con SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Versión 11).

**ANOVA**

Biomasa máxima (g/L)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	31.303	5	6.261	3462.922	.000
Intra-grupos	.022	12	.002		
Total	31.325	17			

**ANOVA**

Productividad biomasa (g/L\*d)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.213	5	.043	1802.047	.000
Intra-grupos	.000	12	.000		
Total	.214	17			

**ANOVA**

Mu (d-1)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.130	5	.026	292.946	.000
Intra-grupos	.001	12	.000		
Total	.131	17			

**ANOVA**Tasa de fijación de CO<sub>2</sub> (g/L\*d)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.755	5	.151	2875.750	.000
Intra-grupos	.001	12	.000		
Total	.756	17			

**ANOVA**

Capacidad de captura (g/L\*d)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	744.301	5	148.860	3376.049	.000
Intra-grupos	.529	12	.044		
Total	744.830	17			

**ANOVA**

Porcentaje de remoción (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	241.812	5	48.362	107.400	.000
Intra-grupos	5.404	12	.450		
Total	247.216	17			

### E) Pruebas pos hoc.

Analizado con SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Versión 11).

#### Biomasa máxima (g/L)

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Luz*CO2	N	Subconjunto para alfa = .05				
		1	2	3	4	5
5620, 10%	3	2.6933				
3260, 10%	3		3.1000			
5620, 5%	3		3.1200			
3260, 5%	3			3.3775		
8000, 10%	3				5.6600	
8000, 5%	3					6.0000
Sig.		1.000	.991	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

#### Productividad biomasa (g/L\*d)

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Luz*CO2	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
3260, 5%	3	.2512		
3260, 10%	3	.2633		
5620, 10%	3		.3067	
5620, 5%	3		.3200	
8000, 5%	3			.5046
8000, 10%	3			.5167
Sig.		.083	.050	.086

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

#### Mu (d-1)

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Luz*CO2	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
3260, 10%	3	.1833			
3260, 5%	3	.1834			
5620, 5%	3		.2287		
5620, 10%	3			.3400	
8000, 5%	3				.3722
8000, 10%	3				.3800
Sig.		1.000	1.000	1.000	.906

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

**Tasa de fijación de CO2 (g/L\*d)**HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Luz*CO2	N	Subconjunto para alfa = .05					
		1	2	3	4	5	6
3260, 5%	3	.4722					
3260, 10%	3		.4933				
5620, 10%	3			.5733			
5620, 5%	3				.6016		
8000, 5%	3					.9487	
8000, 10%	3						.9700
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

**Capacidad de captura (g/L\*d)**HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Luz*CO2	N	Subconjunto para alfa = .05					
		1	2	3	4	5	6
5620, 5%	3	8.2827					
3260, 5%	3		9.1097				
8000, 5%	3			9.8077			
3260, 10%	3				20.4833		
5620, 10%	3					21.9233	
8000, 10%	3						23.0300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

**Porcentaje de remoción (%)**HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Luz*CO2	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
3260, 5%	3	12.8722		
5620, 5%	3	14.2015		
8000, 5%	3	14.4492		
3260, 10%	3		19.2700	
8000, 10%	3			21.1833
5620, 10%	3			22.2333
Sig.		.110	1.000	.438

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

## 2. Pruebas estadísticas para el flujo e intensidad de luz suministrando 5 y 10% CO<sub>2</sub>.

Las hipótesis a probar fueron las siguientes:

*Ho: medias de los parámetros medidos con los dos flujos son iguales*

*Ha: al menos una media es diferente.*

*Ho: medias de los parámetros medidos con los dos suministros de CO<sub>2</sub> son iguales*

*Ha: al menos una media es diferente.*

*Ho: las medias de los parámetros medidos a las dos intensidades de luz son iguales*

*Ha: al menos una media es diferente.*

*Ho: No hay efecto en la interacción del flujo, la intensidad de luz y concentración de CO<sub>2</sub>.*

*Ha: Sí hay efecto en la interacción del flujo, la intensidad de luz y concentración de CO<sub>2</sub>.*

El modelo 2<sup>3</sup> es el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \delta_k + \tau\beta\delta_{ijk} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:  $Y_{ijkl}$ , es el parámetro medido en la l-esima repetición, al que se le aplicó el i-esimo flujo, la j-esima concentración de CO<sub>2</sub>, la k-esima intensidad de luz,  $\mu$  es la media general del parámetro medido,  $\tau_i$  es el efecto del i-esimo flujo sobre el parámetro medido,  $\beta_j$  es el efecto de la j-esima concentración de CO<sub>2</sub>,  $\delta_k$  es el efecto de la k-esima intensidad de luz,  $\tau\beta\delta_{ijk}$  es el efecto de la interacción del flujo  $i$ , la concentración de CO<sub>2</sub>  $j$  y la intensidad de luz  $k$ ,  $\varepsilon_{ijk}$  es el error asociado a la observación  $Y_{ijkl}$ .

Los parámetros medidos fueron: biomasa máxima, productividad máxima, tasa máxima de crecimiento específico, tasa de fijación de CO<sub>2</sub>, capacidad de captura de CO<sub>2</sub>, porcentaje de remoción de CO<sub>2</sub>.

Los niveles probados para la intensidad de luz fueron: 3260, 5620 Lx, para la concentración de CO<sub>2</sub>: 5 y 10 % y para el flujo: 0.4 y 0.8 vvm.

### A) Normalidad de los errores.

Analizado con NCSS (Number Cruncher Statistical Systems, 2007).

▪ Biomasa máxima

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Martinez-Igiewicz	0		1.182263	1.28884	Can't reject normality

▪ Productividad máxima

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Anderson-Darling	0.7355475	5.527263E-02			Can't reject normality

▪ Tasa máxima de crecimiento específico.

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Martinez-Igiewicz	1.079597		1.182263	1.28884	Can't reject normality

▪ Tasa de fijación de CO<sub>2</sub>.

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Anderson-Darling	0.6999391	6.766813E-02			Can't reject normality

▪ Capacidad de captura CO<sub>2</sub>.

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Shapiro-Wilk W	0.9254391	7.712059E-02			Can't reject normality

▪ Porcentaje de remoción de CO<sub>2</sub>.

Test Name	Test value	Prob level	10% critical value	5% critical value	Decision (5%)
Shapiro-Wilk W	0.9615473	0.4702935			Can't reject normality

### B) Estadísticos descriptivos.

Analizado con SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Versión 11).

#### Descriptivos

Biomasa máxima (g/L)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3	3.3775	.03377	.01950	3.2936	3.4614	3.34	3.41
0.4 vvm, 10%, 3260 L	3	3.1000	.03100	.01790	3.0230	3.1770	3.07	3.13
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3	3.1200	.03120	.01801	3.0425	3.1975	3.09	3.15
0.4 vvm, 10%, 5620 L	3	2.6938	.02694	.01555	2.6268	2.7607	2.67	2.72
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3	3.5500	.03550	.02050	3.4618	3.6382	3.51	3.59
0.8 vvm, 10%, 3260 L	3	2.5700	.02570	.01484	2.5062	2.6338	2.54	2.60
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3	3.8000	.03800	.02194	3.7056	3.8944	3.76	3.84
0.8 vvm, 10%, 5620 L	3	3.8000	.03800	.02194	3.7056	3.8944	3.76	3.84
Total	24	3.2514	.44646	.09113	3.0629	3.4399	2.54	3.84

## Descriptivos

Productividad biomasa (g/L\*d)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3	.2512	.00251	.00145	.2450	.2574	.25	.25
0.4 vvm, 10%, 3260 L	3	.2627	.00263	.00152	.2562	.2692	.26	.27
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3	.3200	.00320	.00185	.3121	.3279	.32	.32
0.4 vvm, 10%, 5620 L	3	.3050	.00305	.00176	.2974	.3126	.30	.31
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3	.3240	.00324	.00187	.3160	.3320	.32	.33
0.8 vvm, 10%, 3260 L	3	.1630	.00163	.00094	.1590	.1671	.16	.16
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3	.4500	.00450	.00260	.4388	.4612	.45	.45
0.8 vvm, 10%, 5620 L	3	.4500	.00450	.00260	.4388	.4612	.45	.45
Total	24	.3157	.09321	.01903	.2764	.3551	.16	.45

## Descriptivos

Mu (d-1)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3	.1834	.00000	.00000	.1834	.1834	.18	.18
0.4 vvm, 10%, 3260 L	3	.1860	.02265	.01307	.1298	.2423	.17	.21
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3	.2287	.00000	.00000	.2287	.2287	.23	.23
0.4 vvm, 10%, 5620 L	3	.3386	.00000	.00000	.3386	.3386	.34	.34
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3	.3870	.00000	.00000	.3870	.3870	.39	.39
0.8 vvm, 10%, 3260 L	3	.4440	.00000	.00000	.4440	.4440	.44	.44
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3	.5148	.00000	.00000	.5148	.5148	.51	.51
0.8 vvm, 10%, 5620 L	3	.6931	.00000	.00000	.6931	.6931	.69	.69
Total	24	.3720	.16982	.03466	.3003	.4437	.17	.69

## Descriptivos

Tasa de fijación de CO<sub>2</sub> (g/L\*d)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3	.4722	.00472	.00273	.4605	.4840	.47	.48
0.4 vvm, 10%, 3260 L	3	.4939	.00494	.00285	.4816	.5061	.49	.50
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3	.6016	.00602	.00347	.5867	.6165	.60	.61
0.4 vvm, 10%, 5620 L	3	.5734	.00573	.00331	.5592	.5876	.57	.58
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3	.6091	.00609	.00352	.5940	.6243	.60	.62
0.8 vvm, 10%, 3260 L	3	.3065	.00306	.00177	.2989	.3141	.30	.31
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3	.8460	.00846	.00488	.8250	.8670	.84	.85
0.8 vvm, 10%, 5620 L	3	.8460	.00846	.00488	.8250	.8670	.84	.85
Total	24	.5936	.17524	.03577	.5196	.6676	.30	.85

## Descriptivos

Capacidad de captura (g/L\*d)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3		
0.4 vvm, 10%, 3260 L	3	20.4820	.27422	.15832	19.8008	21.1632	20.21	20.76
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3	8.2827	.21529	.12430	7.7479	8.8175	8.07	8.50
0.4 vvm, 10%, 5620 L	3	21.9235	.21409	.12360	21.3917	22.4553	21.73	22.15
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3	13.5200	.30000	.17321	12.7748	14.2652	13.22	13.82
0.8 vvm, 10%, 3260 L	3	21.9820	2.50000	1.44338	15.7717	28.1923	19.48	24.48
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3	16.7442	.51796	.29904	15.4575	18.0309	16.26	17.29
0.8 vvm, 10%, 5620 L	3	51.2420	.65727	.37948	49.6093	52.8747	50.58	51.90
Total	24	20.4108	13.00125	2.65387	14.9208	25.9007	8.07	51.90

## Descriptivos

Porcentaje de remoción (%)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3		
0.4 vvm, 10%, 3260 L	3	19.2700	.85623	.49434	17.1430	21.3970	18.41	20.13
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3	14.2015	.79259	.45760	12.2325	16.1704	13.46	15.04
0.4 vvm, 10%, 5620 L	3	22.2330	.46597	.26903	21.0754	23.3905	21.77	22.70
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3	14.4402	.34657	.20009	13.5793	15.3011	14.09	14.79
0.8 vvm, 10%, 3260 L	3	10.8000	1.56423	.90311	6.9142	14.6858	9.24	12.36
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3	12.6200	.62715	.36209	11.0621	14.1779	11.99	13.25
0.8 vvm, 10%, 5620 L	3	25.0200	.43251	.24971	23.9456	26.0944	24.59	25.45
Total	24	16.4321	4.93543	1.00744	14.3481	18.5162	9.24	25.45

## C) Homogeneidad de varianzas.

Analizado con SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Versión 11).

## Prueba de homogeneidad de varianzas

Biomasa máxima (g/L)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.081	7	16	.999

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

Productividad biomasa (g/L\*d)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.352	7	16	.917

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

Mu (d-1)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
16.000	7	16	.000

**Prueba de homogeneidad de varianzas**Tasa de fijación de CO<sub>2</sub> (g/L\*d)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.352	7	16	.917

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

Capacidad de captura (g/L\*d)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.661	7	16	.050

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

Porcentaje de remoción (%)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.965	7	16	.488

**D) Análisis de varianza.**

Analizado con SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Versión 11).

**ANOVA**

Biomasa máxima (g/L)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4.567	7	.652	606.285	.000
Intra-grupos	.017	16	.001		
Total	4.585	23			

**ANOVA**

Productividad biomasa (g/L\*d)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.200	7	.029	2640.837	.000
Intra-grupos	.000	16	.000		
Total	.200	23			

**ANOVA**

Mu (d-1)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.662	7	.095	1475.796	.000
Intra-grupos	.001	16	.000		
Total	.663	23			

**ANOVA**

Tasa de fijación de CO<sub>2</sub> (g/L\*d)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.706	7	.101	2640.837	.000
Intra-grupos	.001	16	.000		
Total	.706	23			

**ANOVA**

Capacidad de captura (g/L\*d)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3873.176	7	553.311	607.649	.000
Intra-grupos	14.569	16	.911		
Total	3887.745	23			

**ANOVA**

Porcentaje de remoción (%)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	549.974	7	78.568	122.383	.000
Intra-grupos	10.272	16	.642		
Total	560.246	23			

**E) Pruebas pos hoc.**

Analizado con SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Versión 11).

**Biomasa máxima (g/L)**HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Flujo-Luz-CO2	N	Subconjunto para alfa = .05					
		1	2	3	4	5	6
0.8 vvm, 10%, 3260 Lx	3	2.5700					
0.4 vvm, 10%, 5620 Lx	3		2.6938				
0.4 vvm, 10%, 3260 Lx	3			3.1000			
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3			3.1200			
0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3				3.3775		
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3					3.5500	
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3						3.8000
0.8 vvm, 10%, 5620 Lx	3						3.8000
Sig.		1.000	1.000	.994	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

## Productividad biomasa (g/L\*d)

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Flujo-Luz-CO2	N	Subconjunto para alfa = .05					
		1	2	3	4	5	6
0.8 vvm, 10%, 3260 Lx	3	.1630					
0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3		.2512				
0.4 vvm, 10%, 3260 Lx	3			.2627			
0.4 vvm, 10%, 5620 Lx	3				.3050		
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3					.3200	
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3					.3240	
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3						.4500
0.8 vvm, 10%, 5620 Lx	3						.4500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.802	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

## Mu (d-1)

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Flujo-Luz-CO2	N	Subconjunto para alfa = .05						
		1	2	3	4	5	6	7
0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3	.1834						
0.4 vvm, 10%, 3260 Lx	3	.1860						
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3		.2287					
0.4 vvm, 10%, 5620 Lx	3			.3386				
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3				.3870			
0.8 vvm, 10%, 3260 Lx	3					.4440		
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3						.5148	
0.8 vvm, 10%, 5620 Lx	3							.6931
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

## Tasa de fijación de CO2 (g/L\*d)

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Flujo-Luz-CO2	N	Subconjunto para alfa = .05					
		1	2	3	4	5	6
0.8 vvm, 10%, 3260 Lx	3	.3065					
0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3		.4722				
0.4 vvm, 10%, 3260 Lx	3			.4939			
0.4 vvm, 10%, 5620 Lx	3				.5734		
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3					.6016	
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3					.6091	
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3						.8460
0.8 vvm, 10%, 5620 Lx	3						.8460
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.802	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

### Capacidad de captura (g/L\*d)

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Flujo-Luz-CO2	N	Subconjunto para alfa = .05				
		1	2	3	4	5
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3	8.2827				
0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3	9.1097				
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3		13.5200			
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3			16.7442		
0.4 vvm, 10%, 3260 Lx	3				20.4820	
0.4 vvm, 10%, 5620 Lx	3				21.9235	
0.8 vvm, 10%, 3260 Lx	3				21.9820	
0.8 vvm, 10%, 5620 Lx	3					51.2420
Sig.		.956	1.000	1.000	.554	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

### Porcentaje de remoción (%)

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Interacción Flujo-Luz-CO2	N	Subconjunto para alfa = .05				
		1	2	3	4	5
0.8 vvm, 10%, 3260 Lx	3	10.8000				
0.8 vvm, 5%, 5620 Lx	3	12.6200	12.6200			
0.4 vvm, 5%, 3260 Lx	3	12.8722	12.8722			
0.4 vvm, 5%, 5620 Lx	3		14.2015			
0.8 vvm, 5%, 3260 Lx	3		14.4402			
0.4 vvm, 10%, 3260 Lx	3			19.2700		
0.4 vvm, 10%, 5620 Lx	3				22.2330	
0.8 vvm, 10%, 5620 Lx	3					25.0200
Sig.		.086	.168	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

México D.F. a 8 de Marzo del 2010

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa  
aprobó la tesis

**“Captura de CO<sub>2</sub> por una comunidad de microalgas obtenidas de un  
ecosistema natural mexicano”.**

que presentó

I.B.I. Alma Lilia Toledo Cervantes

Comité Tutorial:

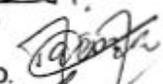
Director: Dr. Sergio Revah Moiseev.

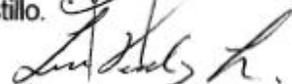
Asesor: Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarria.

Asesor: Dra. María Esther Meave Del castillo.

Jurado:

Presidente: Dr. Alfredo Martínez Jiménez. 

Secretario: Dra. María Esther Meave Del castillo. 

Vocal: Dr. Luis Carlos Fernández Linares. 

Vocal: Dra. Clara Pelayo Zaldivar. 