

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS E INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Tesis de Maestría**

Biofijación de CO<sub>2</sub>, NO y SO<sub>2</sub> presentes en los gases de Plantas  
Termoeléctricas utilizando Microalgas

**Presenta:**

Citlalli Adelaida Arroyo Gómez

**Matrícula:** 2131800963

**Asesores**

Dr. José Luis Contreras Larios

M. en C. María del Rocío Cruz Colín

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	viii
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	ix
<b>1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	1
1.1 Hipótesis	1
1.2 Objetivo General	1
1.3 Objetivos Específicos	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	2
2.1 Componentes de los Gases de Chimenea	2
2.1.1 Compuestos no restringidos por legislación	2
2.1.2 Compuestos restringidos por legislación	2
2.2 Las Microalgas	4
2.3 La Fotosíntesis y la Fijación de Carbono en las Microalgas	5
2.4 Utilización de las Microalgas	7
2.5 Interacción de los gases CO <sub>2</sub> , NO y SO <sub>2</sub> con las microalgas	7
2.5.1 Dióxido de carbono	7
2.5.1.1 Solubilidad del CO <sub>2</sub> en soluciones acuosas	7
2.5.1.2 Metabolismo del carbón inorgánico por las microalgas	8
2.5.2 Óxidos de Nitrógeno	10
2.5.2.1 Solubilidad de los NO <sub>x</sub> en soluciones acuosas	10
2.5.2.2 Consumo de NO <sub>x</sub> y rutas de metabolización en las microalgas	11
2.5.2.3 Remoción de los NO <sub>x</sub> por las microalgas	12
2.5.3 Óxidos de Azufre	13
2.5.3.1 Solubilidad del SO <sub>2</sub> en soluciones acuosas	13

2.5.3.2 Consumo y metabolización del SO <sub>2</sub> por las microalgas	13
2.5.3.3 Efectos del SO <sub>2</sub> en las microalgas	15
2.5.3.4 Remoción del SO <sub>2</sub> por las microalgas	15
2.6 Factores que Modifican el Proceso de Fijación de CO <sub>2</sub> por las microalgas	15
2.6.1 Temperatura	15
2.6.2 pH	16
2.6.3 Intensidad de Luz	16
2.7 Tipos de Fotobiorreactores más utilizados en el cultivo de microalgas	17
2.7.1 Estanques de algas de alta tasa	17
2.7.2 Fotobiorreactor tubular horizontal	18
2.7.3 Fotobiorreactor tubular vertical	18
2.7.3.1 Fotobiorreactor de columna de burbujeo	19
2.7.3.2 Fotobiorreactor <i>Airlift</i>	19
2.8 Modelado del Crecimiento de Microorganismos	20
2.8.1 Balance de Biomasa	21
<b>3. METODOLOGÍA</b>	22
3.1 Materiales y Equipo	22
3.1.1 Sistema de reacción	22
3.1.2 Microorganismo	23
3.1.2.1 Aislamiento e identificación del microorganismo	23
3.1.2.2 Inóculo	24
3.1.3 Medio de cultivo y preservación de la cepa	25
3.2 Cultivo	25
3.3 Métodos Analíticos	26
3.3.1 Análisis de CO <sub>2</sub> en la corriente gaseosa	26
3.3.2 Determinación de biomasa por densidad óptica	26
3.3.3. Alcalinidad	27
3.3.4 Determinación de Nitritos	28

3.3.5 Determinación de Sulfatos	28
3.4 Cálculos de Eficiencia de Utilización de CO <sub>2</sub> y Velocidad específica de crecimiento máxima	29
3.4.1 Cálculo de la eficiencia de utilización de CO <sub>2</sub>	29
3.4.2 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\max}$ )	30
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
4.1 Efecto de la Adición de CO <sub>2</sub> en el Crecimiento de Biomasa	31
4.2 Efecto de la Adición de NO en el Crecimiento de Biomasa	32
4.3 Efecto de la Adición de SO <sub>2</sub> en el Crecimiento de Biomasa	33
4.4 Efecto de la Adición simultánea de NO y SO <sub>2</sub> en el Crecimiento de Biomasa	35
4.5 Eficiencia de Utilización de CO <sub>2</sub> y Velocidad de Fijación de CO <sub>2</sub>	36
4.6 Velocidad Específica de Crecimiento máxima ( $\mu_{\max}$ )	36
4.7 Efecto de los gases SO <sub>2</sub> , (NO y SO <sub>2</sub> ) en el pH del medio de cultivo	38
4.8 Análisis del CO <sub>2</sub> residual expresado como HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y CO <sub>3</sub> <sup>=</sup>	40
4.9 Análisis de Nitritos y Nitratos	42
4.10 Análisis de Sulfatos	44
4.11 Análisis CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> a la salida de los biorreactores	45
4.12 Análisis Cinético de Crecimiento	46
4.13 Balance de CO <sub>2</sub>	48
4.13.1 Balance de CO <sub>2</sub> en la fase líquida	48
4.13.2 Balance de CO <sub>2</sub> en la fase gaseosa	51
4.13.3 Resultados del balance de CO <sub>2</sub> en la fase líquida	52
4.13.4 Resultados del balance de CO <sub>2</sub> en la fase gaseosa	53
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>6. REFERENCIAS</b>	<b>56</b>

<b>APÉNDICES</b>	65
Apéndice A	65
Apéndice B	66
Apéndice C	67
Apéndice D	69
Apéndice E	70
Apéndice F	70
Apéndice G	72

### Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de Calvin para la fijación de CO <sub>2</sub> en organismos fotosintéticos	6
Figura 2. Modelos propuestos para el consumo de CO <sub>2</sub> por las microalgas	9
Figura 3. Metabolismo del N <sub>2</sub> , NO y NO <sub>2</sub> en las microalgas	11
Figura 4. Modelos propuestos para el metabolismo de azufre por las microalgas	14
Figura 5. a) Estanque de algas de alta tasa (HRAP) y b) rueda de paletas que proporciona el mezclado al HRAP	17
Figura 6. Sistema de fotobiorreactores tubulares horizontales	18
Figura 7. Fotobiorreactores de columna de burbujeo	19
Figura 8. Diagrama de las diferentes configuraciones de los biorreactores <i>Airlift</i> . a), b) circuito interno y c) circuito externo	20
Figura 9. Fotobiorreactor tipo <i>Airlift</i>	22
Figura 10. Equipo experimental	23
Figura 11. Microfotografía de la microalga <i>Scenedesmus dimorphus</i>	24
Figura 12. Inóculo de <i>Scenedesmus dimorphus</i>	24
Figura 13. Crecimiento de <i>S. dimorphus</i> con suministro de aire (A) y la mezcla gaseosa (A+CO <sub>2</sub> )	31
Figura 14. Crecimiento de <i>S. dimorphus</i> con suministro de las mezclas gaseosas (A+CO <sub>2</sub> ) y (A+CO <sub>2</sub> +NO)	33
Figura 15. Crecimiento de <i>S. dimorphus</i> con suministro de las mezclas gaseosas(A+CO <sub>2</sub> ) y (A+CO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub> )	34
Figura 16. Crecimiento de <i>S. dimorphus</i> con suministro de las mezclas gaseosas	35

(A+CO<sub>2</sub>+NO),(A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>)

Figura 17. Velocidades de crecimiento máximas, y eficiencias de utilización de CO<sub>2</sub> para todos los cultivos. 37

Figura 18. Variación del pH en los cultivos suministrados con aire (A) y las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO) 39

Figura 19. Variación del pH en los cultivos suministrados con las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>) 40

Figura 20. Carbón inorgánico disuelto en los cultivos con suministro de aire (A) y las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO) 41

Figura 21. Carbón inorgánico disuelto en los cultivos con suministro de las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>) 42

Figura 22. Nitritos disueltos en los cultivos con suministro de las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) 43

Figura 23. Nitritos disueltos en los cultivos con suministro de las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>+NO) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>) 44

Figura 24. Variación del SO<sub>2</sub> absorbido en los cultivos con suministro de las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>) 45

Figura 25. CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa a la salida de los reactores con alimentación de aire (A) y la mezcla gaseosa (A+CO<sub>2</sub>) 45

Figura 26. Oxígeno en la fase gaseosa a la salida de los reactores con alimentación de aire (A) y la mezcla gaseosa (A+CO<sub>2</sub>) 46

Figura 27. Concentración de biomasa y de sustrato en el cultivo alimentado con aire en el que se aplicó la ecuación de Monod. 47

Figura 1C. Cromatograma de referencia 68

Figura 2C. Curva de calibración para la determinación cromatográfica de CO<sub>2</sub> 68

Figura 1D. Espectro visible de la biomasa de *S. dimorphus* 69

Figura 2D. Curva de calibración para la determinación de biomasa por densidad óptica 70

Figura 1F. Reacción de Griess para la determinación de nitritos 71

Figura 2F. Curva de calibración para la determinación de nitritos 71

Figura 1G. Curva de calibración para la determinación de sulfatos 72

## Lista de Tablas

Tabla 1. Composición de las diferentes mezclas de gases suministradas a los biorreactores	25
Tabla 2. Identificación de aniones en la determinación de alcalinidad	27
Tabla 3. Velocidades específicas de crecimiento máximas, productividades, velocidades de fijación de CO <sub>2</sub> (Fc) y Eficiencias de Utilización de CO <sub>2</sub> (Ec) por <i>S. dimorphus</i> alimentada con las diferentes mezclas de gases	37
Tabla 4. Reacciones en el equilibrio químico más relevantes que se pueden tener en los biorreactores	38
Tabla 5. Ecuaciones de los polinomios de ajuste de datos experimentales para calcular la derivada y con ello calcular la velocidad de crecimiento celular para los cultivos alimentados con las diferentes mezclas de gases.	47
Tabla 6. Derivadas de los polinomios de ajuste de datos experimentales para los cultivos alimentados con las diferentes mezclas de gases.	48
Tabla 7. Constantes utilizadas en el cálculo del balance de CO <sub>2</sub> en la fase líquida y en la fase gaseosa	51
Tabla 8. Resultados de la acumulación de CO <sub>2</sub> en el medio líquido	52
Tabla 9. Resultados de la acumulación de CO <sub>2</sub> en la fase gaseosa	53

Nomenclatura	
Símbolo	Significado
A	Suministro de Aire
A+CO <sub>2</sub>	Mezcla gaseosa con 88% aire y 12% CO <sub>2</sub>
A+CO <sub>2</sub> +NO	Mezcla gaseosa con 88.79% aire, 12% CO <sub>2</sub> y 100 ppm NO
A+CO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub>	Mezcla gaseosa con 88.79% aire, 12% CO <sub>2</sub> y 60 ppm SO <sub>2</sub>
A+CO <sub>2</sub> +NO+SO <sub>2</sub>	Mezcla gaseosa con 88.78% aire, 12% CO <sub>2</sub> , 100 ppm NO y 60 ppm SO <sub>2</sub>
Ec	Eficiencia de utilización de CO <sub>2</sub> (%)
Fc	Velocidad de Fijación de CO <sub>2</sub> (g CO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
μ	Velocidad específica de crecimiento (d <sup>-1</sup> )
μ <sub>max</sub>	Velocidad específica de crecimiento máxima (d <sup>-1</sup> )
r <sub>g</sub>	Velocidad de crecimiento celular [g/L]
C <sub>c</sub>	Concentración de células o de biomasa [g/L]
C <sub>s</sub>	Concentración de sustrato [g/L]
K <sub>s</sub>	Constante de la ecuación de Monod [g/L]
V <sub>1</sub>	volumen del líquido (L)
Kl <sub>CO2</sub>	Coeficiente de transferencia de masa gas – líquido (m s <sup>-1</sup> )
a <sub>v</sub>	Área interfacial gas – líquido (m <sup>-1</sup> )

He	Constante de Henry para el equilibrio gas – líquido (adimensional)
[CO <sub>2g</sub> ]	Concentración de CO <sub>2</sub> en la fase gaseosa (g L <sup>-1</sup> )
[CO <sub>2l</sub> ]	Concentración de CO <sub>2</sub> en la fase líquida (g L <sup>-1</sup> )
Y <sub>C/s</sub>	Rendimiento máximo de carbono en biomasa (%)
C	Biomasa (g L <sup>-1</sup> )
Δρ	densidad del líquido – densidad del CO <sub>2</sub> (g cm <sup>-3</sup> )
g <sub>1</sub>	constante de aceleración de la gravedad (cm s <sup>-2</sup> )
D <sub>CO<sub>2</sub></sub>	difusividad del CO <sub>2</sub> en agua (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
μ <sub>l</sub>	viscosidad del líquido (g cm <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
V <sub>B1</sub>	volumen de burbuja (cm <sup>3</sup> )
d <sub>b</sub>	diámetro de burbuja (cm)
V <sub>B2</sub>	retención del gas (adimensional)
Q <sub>g</sub>	flujo volumétrico de la mezcla gaseosa (L min <sup>-1</sup> )
L	longitud del líquido (cm)
V <sub>1</sub>	volumen del líquido (L)
P <sub>CO<sub>2</sub></sub>	presión parcial del CO <sub>2</sub> en la mezcla gaseosa (atm)
V	volumen del gas (L)
n	número de moles (mol)
R	constante de los gases ideales (L atm mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
T	temperatura del gas (K)
PM	peso molecular del CO <sub>2</sub> (g mol <sup>-1</sup> )
V <sub>g</sub> =	volumen del reactor correspondiente a la fase gaseosa (L)
Q <sub>g</sub> alimentado =	flujo volumétrico del gas alimentado (L min <sup>-1</sup> )
[CO <sub>2</sub> alimentado]=	Concentración de CO <sub>2</sub> alimentado (g L <sup>-1</sup> )
Q <sub>g</sub> salida =	flujo volumétrico de CO <sub>2</sub> a la salida del reactor (L min <sup>-1</sup> )
[CO <sub>2</sub> salida] =	Concentración de CO <sub>2</sub> a la salida del reactor (g L <sup>-1</sup> )



## RESUMEN

En esta investigación, los efectos que tienen los gases óxido nítrico (NO) y dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) en la fijación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) durante el crecimiento de la microalga *Senedesmus dimorphus* fueron hechos. La microalga del presente estudio fue aislada del lago de Chapultepec en la Ciudad de México. Los experimentos fueron llevados a cabo en tres reactores del tipo Airlift que fueron suministrados con aire y cuatro diferentes mezclas de gases: (aire – 12% CO<sub>2</sub>), (aire – 12% CO<sub>2</sub> – 100 ppm NO), (aire – 12% CO<sub>2</sub> – 60 ppm SO<sub>2</sub>) y (aire – 12% CO<sub>2</sub> – 100 ppm NO – 60 ppm SO<sub>2</sub>). Las mezclas utilizadas fueron hechas con una composición similar a la composición de las emisiones de una Planta Termoeléctrica.

En este estudio se encontró que la microalga *S. dimorphus* fue capaz de utilizar el NO como fuente de nitrógeno para la formación de biomasa, ya que el cultivo que se alimentó con la mezcla de 12% CO<sub>2</sub> y 100 ppm NO mostro la mayor eficiencia de utilización de CO<sub>2</sub> (0.2 %) y la mayor velocidad de fijación de CO<sub>2</sub> (0.051 g CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>).

Así mismo, la microalga asimiló mejor el NO que los NO<sub>3</sub><sup>-</sup> que son utilizados en los medios de cultivo comerciales. Sin embargo la adición de NO redujo el tiempo del período de mantenimiento celular después de que se alcanzó la máxima concentración de biomasa. En los experimentos la adición de SO<sub>2</sub> a los reactores mostró un efecto inhibitorio en el crecimiento de la microalga y con esto también la eficiencia de utilización de CO<sub>2</sub> (0.11%).

## ABSTRACT

In this research, the effects of the nitric oxide (NO) and sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) gases in the fixation of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) during the growth of the microalgae *Senedesmus dimorphus* were made. The microalgae of this study were isolated from the Chapultepec Lake in Mexico City. The experiments were conducted in three *Airlift* reactors which were supplied with air and four different gas mixtures: (air - 12% CO<sub>2</sub>), (air - 12% CO<sub>2</sub> - 100 ppm NO), (air - 12% CO<sub>2</sub> - 60 ppm SO<sub>2</sub>) and (air - 12% CO<sub>2</sub> - 100 ppm NO - 60 ppm SO<sub>2</sub>). The mixtures used were made with a similar composition to the composition of emissions from a power plant. In this study, the microalga *S. dimorphus* was able to use the NO as a the nitrogen source for its biomass formation because the culture being fed with the mixture of 12% CO<sub>2</sub> and 100 ppm showed an increased efficiency of use of CO<sub>2</sub> (0.2%) and also an increased CO<sub>2</sub> fixation rate (CO<sub>2</sub> 0.051 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Also, the microalgae assimilated NO better than NO<sub>3</sub><sup>-</sup> which was used in commercial culture media.

However, the addition of NO reduced the period of time of cell maintenance after the maximum concentration of biomass was reached. In these experiments, the addition of SO<sub>2</sub> gas to the reactors showed an inhibitory effect on the growth of the microalgae, and thus also the efficiency of utilization of CO<sub>2</sub> (0.11%).

## INTRODUCCION

El calentamiento global es principalmente debido a la emisión de gases de efecto invernadero y es un tema de importancia ambiental. En la actualidad el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) es el componente que se encuentra en mayor concentración entre los gases de efecto invernadero y es generado principalmente a partir de la quema de combustibles fósiles (Metz *et al.*, 2005).

La generación de electricidad, el proceso de obtención de gas natural, la fabricación de cemento, fierro y acero son las actividades antropogénicas que más contribuyen en la generación del CO<sub>2</sub> atmosférico, siendo las plantas termoeléctricas las responsables de alrededor del 22% de las emisiones a nivel mundial (Siegaenthaler *et al.*, 2005). Estas industrias requieren de la quema de combustibles fósiles tales como carbón mineral, aceite, gas natural y combustóleo, para poder llevar a cabo sus procesos.

El gas de combustión emitido de estas fuentes contiene nitrógeno (N<sub>2</sub>) principalmente y también en menores cantidades, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), oxígeno (O<sub>2</sub>), vapor de agua, monóxido de carbono (CO), partículas, óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) y óxidos de azufre (SO<sub>x</sub>). Los dos últimos componentes, NO<sub>x</sub> y SO<sub>x</sub>, contribuyen a la formación de smog fotoquímico y son los responsables de la lluvia ácida la cual puede dañar seriamente la salud de las personas (Berberoglou *et al.*, 2009).

La generación de electricidad en México ha mostrado ser una gran fuente de contaminación atmosférica a nivel nacional (López *et al.*, 2004). En el año 2011, la capacidad efectiva instalada en México era de 52,511 Mega Watts en todo el país. La mayoría de la energía eléctrica producida provino de la quema de gas natural (56.15%), seguida de la quema de combustóleo y diésel (20.58%). La combustión de carbón generó 14.14% de la electricidad, mientras que el uranio produjo solo el 4.9% (SENER, 2012).

En el año 2010 el sector eléctrico produjo las siguientes cantidades de contaminantes al aire: 115 millones de toneladas de CO<sub>2</sub>, 1.5 millones de toneladas de SO<sub>2</sub> y 357,500 toneladas de NO<sub>x</sub> (SEMARNAT, 2012).

Como se puede observar el panorama se presenta difícil, desde el punto de vista ambiental, por lo que se hace necesario buscar y aplicar procesos alternativos de obtención de energía, que sean sustentables y que permitan el desarrollo de tecnologías limpias.

El ciclo del carbono, uno de los principales ciclos biogeoquímicos, plantea la posibilidad de utilizar el proceso de fijación de CO<sub>2</sub>, además de SO<sub>2</sub> y NO<sub>x</sub>, utilizando organismos como las microalgas (Radmann *et al.*, 2011), siendo este proceso, un ejemplo de la forma sustentable con que deberían realizarse los procesos industriales, ya que las emisiones de CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> y NO<sub>x</sub> pueden ser utilizadas para el cultivo de microalgas y éstas a su vez pueden ser utilizadas para la obtención de otros productos de importancia industrial, así se pueden reducir las emisiones de gases contaminantes a la atmósfera y se aprovecha de manera integral a estos organismos.

Las microalgas de los géneros *Anacystis*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Emiliana*, *Monoraphidium*, *Rhodobacter*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Synechococcus*, y *Tetraselmisnanocloropsis* entre muchas otras, se han estudiado con el propósito de fijar el CO<sub>2</sub> y se ha encontrado que tienen la característica de fijar CO<sub>2</sub> a concentraciones de aproximadamente 10 a 20% (Chang *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2013). Cabe mencionar que las microalgas tienen una eficiencia fotosintética más alta que las plantas verdes y pueden crecer en medios de composición muy simple. Actualmente, las microalgas son de interés comercial, ya que poseen una gran variedad de aplicaciones, desde suplementos alimenticios hasta la producción de biodiesel (Medina *et al.*, 2012).

# **1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **1.1 HIPÓTESIS**

Las microalgas pueden además de utilizar CO<sub>2</sub> para su desarrollo, fijar ciertas cantidades de otros gases como NO y SO<sub>2</sub>, los cuales son emitidos constantemente al aire por plantas termoeléctricas.

## **1.2 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la eficiencia de fijación de CO<sub>2</sub> de una microalga en presencia de NO y SO<sub>2</sub> de un efluente gaseoso similar al de una Planta Termoeléctrica

## **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aislar una microalga a partir de un cuerpo de agua natural.
2. Emplear un fotobiorreactor tipo *Airlift* a nivel laboratorio para el desarrollo de la microalga aislada.
3. Simular en el fotobiorreactor las condiciones de emisión de CO<sub>2</sub>, NO y SO<sub>2</sub> similares a las de una planta termoeléctrica.
4. Cuantificar las concentraciones de CO<sub>2</sub>, NO y SO<sub>2</sub> fijadas por la microalga.
5. Calcular el rendimiento de fijación de los gases y las correlaciones cinéticas del estudio.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Componentes de los Gases de Chimenea**

El gas proveniente de los procesos de combustión contiene muchos compuestos: aquellos que no están restringidos por legislación: nitrógeno (N<sub>2</sub>), oxígeno (O<sub>2</sub>) y vapor de agua (H<sub>2</sub>O); y los que están restringidos por la legislación y se deben remover con tratamientos: dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), óxidos de azufre (SO<sub>x</sub>), monóxido de carbono (CO), hidrocarburos, partículas, metales pesados, cloruros (Cl<sup>-</sup>), fluoruros (F<sup>-</sup>) y sus derivados.

#### **2.1.1 Compuestos no restringidos por legislación**

Ya que la mayoría de los procesos de combustión utilizan aire, a excepción de los procesos en donde se usa oxígeno puro, los gases generados contienen principalmente N<sub>2</sub>, el cual no tiene una gran participación en el proceso de combustión, pero a pequeñas concentraciones (< 0.1 %), puede ser oxidado a óxidos de nitrógeno, los cuales si representan un riesgo para el ambiente (Merker *et al.*, 2006). Ya que un exceso de O<sub>2</sub> es necesario para un buen proceso de combustión, éste siempre está presente en el gas de chimenea a concentraciones relativamente elevadas. El vapor de agua también está presente en este gas, pero a pesar de ser un gas de efecto invernadero, no existe actualmente ningún estándar en la legislación para el vapor de agua en el gas de chimenea debido a su bajo tiempo de residencia en la atmósfera de alrededor de 9 días (Schmidt *et al.*, 2010).

#### **2.1.2 Compuestos restringidos por legislación**

El CO<sub>2</sub> es un gas de efecto invernadero con un tiempo de vida atmosférico de 50 a 200 años (Hammitt *et al.*, 1996) y se forma durante la quema de los combustibles. Su concentración en el gas de chimenea depende principalmente del tipo de combustible, por ejemplo, los gases de combustión de las plantas termoeléctricas que utilizan gas natural, contienen de 5 a 6% de CO<sub>2</sub> y 10 a 15% para los que provienen de la combustión del carbón. En los procesos con combustión de O<sub>2</sub>, las concentraciones de CO<sub>2</sub> están por encima del 75% en el gas húmedo y 90% en el gas seco (Kanniche *et al.*, 2010).

Los gases de combustión contienen diferentes especies de NO<sub>x</sub>. El óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) son las especies de NO<sub>x</sub> mayoritariamente presentes, mientras que el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), el dióxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el trióxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), el tetraóxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) y el trióxido de nitrógeno (NO<sub>3</sub>) no se encuentran en cantidades significativas en el gas de chimenea (Shalska *et al.*, 2010).

El NO y el NO<sub>2</sub> son de importancia ambiental, ya que ambos son los mayores contribuyentes del “smog fotoquímico”, la formación de lluvia ácida y el ozono troposférico en el aire urbano (Kurvitz y Marta, 1998). Además, participan en los procesos de eutroficación y en la remoción de ozono de la estratósfera, resultando en un incremento de la radiación ultravioleta que alcanza la superficie de la tierra (Johnston, 1992).

Los óxidos de azufre (SO<sub>x</sub>) se presentan cuando el azufre, sulfuros de hidrógeno o compuestos organosulfurados, tales como tiofenos, benzotiofenos, alquilbenzotiofenos, se queman. La principal especie de SO<sub>x</sub> que se forma en los procesos de combustión es el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>). Muchos factores, como la temperatura, humedad, intensidad de luz, el transporte atmosférico y las características superficiales de la materia particulada, pueden influir en las reacciones químicas atmosféricas del dióxido de azufre. Cualquiera que sea el proceso involucrado, la mayor parte del dióxido de azufre en la atmósfera se oxida finalmente a ácido sulfúrico y sales de sulfato (Manahan, 2007).

Algunas de las posibles maneras en que el SO<sub>2</sub> puede reaccionar en la atmósfera (Manahan, 2007) son las siguientes:

- Reacciones fotoquímicas
- Reacciones fotoquímicas y químicas en presencia de óxidos de nitrógeno y/o hidrocarburos  
Procesos químicos en las gotas de agua
- Reacciones en las partículas sólidas en la atmósfera

La reacción en fase gaseosa más importante que conduce a la oxidación del SO<sub>2</sub> es la adición del radical OH• (Ecuación 1).



Formando un radical libre reactivo el cual se convierte finalmente a una forma de sulfato.

Algunos solutos disueltos en el agua catalizan la oxidación del SO<sub>2</sub> acuoso. Tanto el ión ferroso Fe (II) como el Mn (II) tienen este efecto. Las reacciones catalizadas por estos iones son más rápidas a medida que aumenta el pH. Las especies disueltas de nitrógeno, NO<sub>2</sub>, y ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), oxidan el SO<sub>2</sub> acuoso. El nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) disuelto puede reaccionar fotoquímicamente para producir radicales OH<sup>•</sup> y esta especie a su vez puede actuar oxidando el sulfito disuelto (Manahan, 2007).

## 2.2 Las Microalgas

Las algas están típicamente subdivididas en microalgas y macroalgas de acuerdo a su tamaño. Las macroalgas tienen células organizadas en estructuras parecidas a las hojas, tallos y raíces de las plantas superiores, algunas llegan a medir 60 m de longitud. Las microalgas son organismos microscópicos fotosintéticos, cuyo tamaño va desde 3 a 10 μm y se encuentran principalmente en hábitats acuáticos, como: agua dulce, agua salobre (< 3.5% de sal), marina (3.5% de sal), e hipersalina (> 3.5% de sal), así como en ambientes con un amplio intervalo de temperaturas y pH (Yang *et al.*, 2006).

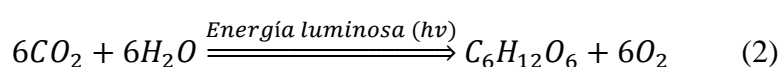
Pueden ser autotróficas o heterotróficas, las primeras requieren como fuente de carbono al CO<sub>2</sub>, sales y una fuente de energía luminosa para desarrollarse, las últimas son no fotosintéticas por lo que su fuente de carbono generalmente son los azúcares. Algunas microalgas son mixotróficas, como la especie *Chlorella*, la cual tiene la habilidad de llevar a cabo la fotosíntesis y puede asimilar nutrientes orgánicos de otras fuentes (Wang *et al.*, 2003; De-Bashan *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2010).

Las microalgas también se pueden subdividir en dos amplias categorías: las cianobacterias procariotas y las verdaderas microalgas eucariotas. Las cianobacterias, frecuentemente referidas como las algas verde-azules, tienen la clorofila II y no poseen cloroplastos. Tienen un elevado contenido de proteínas, así como un 70% de masa seca y un bajo contenido de grasas de aproximadamente el 5%. Las microalgas eucariotas son ricas en lípidos y son consideradas las principales especies de algas para la producción de biocombustibles (Yang *et al.*, 2006).

### 2.3 La Fotosíntesis y la fijación de carbono en las microalgas

Los organismos fotosintéticos atrapan la luz solar formando ATP (Adenosin Tri-Fosfato) y NADH (Nicotinamida Dinucleótido reducido), que utilizan como fuente de energía para fabricar glúcidos y otros componentes orgánicos a partir de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O; liberando O<sub>2</sub> a la atmósfera en forma simultánea (Lehninger, 1987).

La ecuación global de la fotosíntesis describe una reacción de oxidación-reducción en la que el H<sub>2</sub>O cede electrones (en forma de hidrógeno) para la reducción del CO<sub>2</sub> y formar una molécula de glucosa (Ecuación 2) (Lehninger, 1987; Smith 1997).



La fotosíntesis abarca dos procesos: las reacciones luminosas y las reacciones oscuras. En las reacciones luminosas se absorbe energía luminosa por la clorofila y otros pigmentos de las células fotosintéticas conservándola en forma química mediante los dos productos ricos en energía ATP y NADPH (Nicotinamida Dinucleótido fosforilado); simultáneamente se elimina O<sub>2</sub>. En las reacciones oscuras, tiene lugar la fijación de carbono, en donde se utilizan el ATP y el NADPH para reducir el CO<sub>2</sub> formando glucosa y otros productos orgánicos. La formación de O<sub>2</sub> sólo se lleva a cabo en las reacciones luminosas (Lehninger, 1987).

En las microalgas eucarióticas tanto las reacciones lumínicas como de fijación de carbono tienen lugar en los cloroplastos. Estos están rodeados de una membrana externa que es permeable a pequeñas moléculas e iones. Un sistema membranoso interno encierra el compartimiento interno en el que hay muchas vesículas o sacos aplanados y rodeados de membrana llamados tilacoides, que están normalmente ordenados en forma de pilas llamadas grana. Los pigmentos fotosintéticos y todas las enzimas necesarias para las reacciones lumínicas están incrustadas en las membranas tilacoides. El fluido del compartimiento que rodea los tilacoides, el estroma, contiene la mayoría de las enzimas requeridas para las reacciones de fijación de carbono (Lehninger, 1987).

La fijación del dióxido de carbono tiene lugar en tres fases, las cuales conforman el ciclo de Calvin (Figura 1). La primera fase en la fijación del CO<sub>2</sub> es la condensación con un aceptor de cinco carbonos, la ribulosa-1,5-bifosfato, formando dos moléculas de 3-fosfoglicerato. En la segunda fase el 3-fosfoglicerato se reduce a gliceraldehído-3-fosfato: se fijan tres moléculas de CO<sub>2</sub> a tres moléculas de ribulosa-1,5-bifosfato para formar seis moléculas de gliceraldehído-3-fosfato (18 carbonos) (Lehninger, 1987).



Una molécula de esta triosa fosfato (tres carbonos) puede utilizarse para condensarse dando hexosas fosfato utilizadas en la síntesis de almidón y sacarosa. En la tercera fase se utilizan cinco de las seis moléculas de gliceraldehído-3-fosfato (15 carbonos) en la regeneración de tres moléculas de ribulosa-1,5-bifosfato, el material inicial. De este modo el proceso es cíclico y permite la conversión continua de CO<sub>2</sub> en triosas y hexosas (Lehninger, 1987).

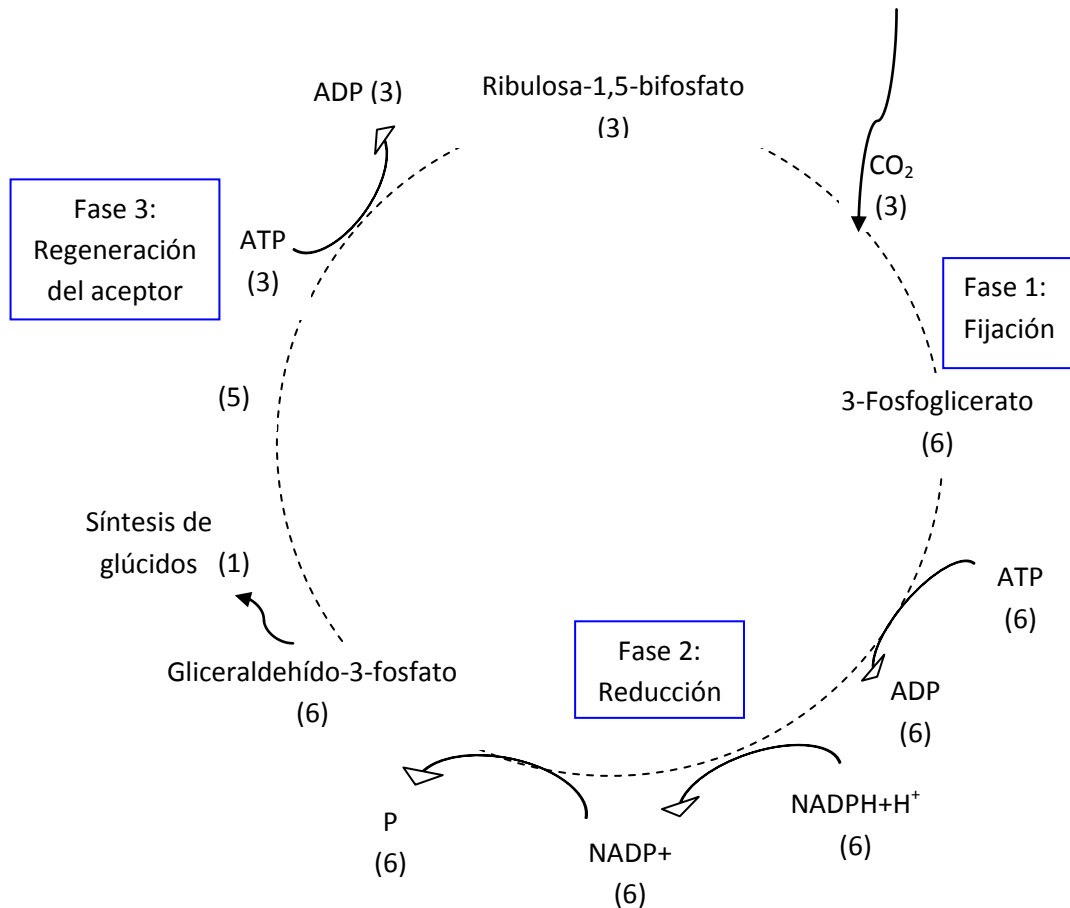


Figura 1. Ciclo de Calvin para la fijación de CO<sub>2</sub> en organismos fotosintéticos (Lehninger, 1987).

## 2.4 Utilización de las Microalgas

En los últimos años se han logrado avances importantes en la utilización de microalgas para diversos fines como salud humana, cosmetología, purificación de aguas residuales, prevención de contaminación acuática, industria farmacéutica, acuicultura, producción de pigmentos y antibióticos, así mismo, se plantea su utilización en granjas captadoras de CO<sub>2</sub> por ser microorganismos fotosintéticos muy eficientes. Se han reportado 439 especies que podrían ser utilizadas como alternativas de alimentación para el hombre y otros animales (Medina *et al.*, 2012)

En países como Alemania, Perú, India, Japón y México, se ha registrado que algunas especies de microalgas son un excelente complemento alimenticio para el hombre. Por ejemplo, las harinas de *Spirulina* y *Scenedesmus* se caracterizan por su alto valor proteico y sin efectos tóxicos. Además, como alimento para larvas de organismos acuáticos resaltan *Chaetoceros* y *Thalassiosira* y por su interés comercial *Dunaliella* para la producción de biodiesel (Medina *et al.*, 2012).

## 2.5 Interacción de los gases CO<sub>2</sub>, NO y SO<sub>2</sub> con las microalgas

### 2.5.1 Dióxido de carbono

#### 2.5.1.1 Solubilidad del CO<sub>2</sub> en soluciones acuosas

La transferencia del CO<sub>2</sub> al líquido es rápida, debido a su relativamente elevada solubilidad (1.496 g CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> en agua a 25°C). La cual es dependiente del pH, incrementándose con la presión y disminuyendo con el incremento en la concentración de compuestos y el incremento en la temperatura (Li *et al.*, 2010).

Cuando el CO<sub>2</sub> se disuelve en un medio acuoso reacciona a través de varios equilibrios (Ecuaciones 3 a 6). A un pH más bajo de 8, la principal vía es la hidratación (Ecuación 3) (Housecroft y Sharpe, 2005; Stumm y Morgan, 1981)



La hidratación del CO<sub>2</sub> es lenta, mientras que la disociación del ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Reacciones 4 y 5) es tan rápida que el H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y el ion carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) están en equilibrio (Ecuaciones 5 y 6) (Dreybrodt *et al.*, 1996).

A un pH arriba de 10, la principal vía es por el ataque de los iones hidróxido (OH<sup>-</sup>) (Ecuaciones 7 y 8) (Housecroft y Sharpe, 2005):



Así, en medios acuosos con un pH entre 6 y 10 (el pH más común para los cultivos de microalgas), el ion bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) es la especie predominante, cuando el CO<sub>2</sub> es disuelto.

### 2.5.1.2 Metabolización del CO<sub>2</sub> por las microalgas

El carbón es el elemento mayoritario de las microalgas. El contenido de carbón de las microalgas puede estar entre el 36 y 65% de su composición. El CO<sub>2</sub> se puede difundir libremente a través de la membrana plasmática (Figura 2). La *Rubisco* (ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) es la primera enzima en el Ciclo de Calvin que asimila el CO<sub>2</sub> convirtiéndolo a ácido 3-fosfoglicérico (3-GPA). Además de la actividad como carboxilasa, la *Rubisco* tiene actividad de oxigenasa, utilizando el O<sub>2</sub> para formar 3-GPA y fosfoglicolato. Este último, es entonces metabolizado vía fotorrespiración, conduciendo a una pérdida en la fijación de CO<sub>2</sub>. Para que no exista esa pérdida debe existir una elevada concentración de CO<sub>2</sub> intracelular (Graham y Wilcox, 2000).

El ion bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) también puede ser consumido por las microalgas, pero requiere un sistema de transporte o su conversión previa a CO<sub>2</sub> (Giordano *et al.*, 2005<sub>b</sub>). El HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el CO<sub>2</sub> pueden ser interconvertidos en la reacción reversible catalizada por la enzima anhidraza carbónica (CA) de acuerdo a la Ecuación 9 (Lane *et al.*, 2005):



La CA interna se localiza en los cloroplastos y pirenoides en las microalgas eucariotas (Figura 2). Otra forma en la que las microalgas pueden generar CO<sub>2</sub> a partir de bicarbonato es excretando H<sup>+</sup> a través de la membrana, el cual reacciona con el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> para dar CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Graham y Wilcox, 2000).

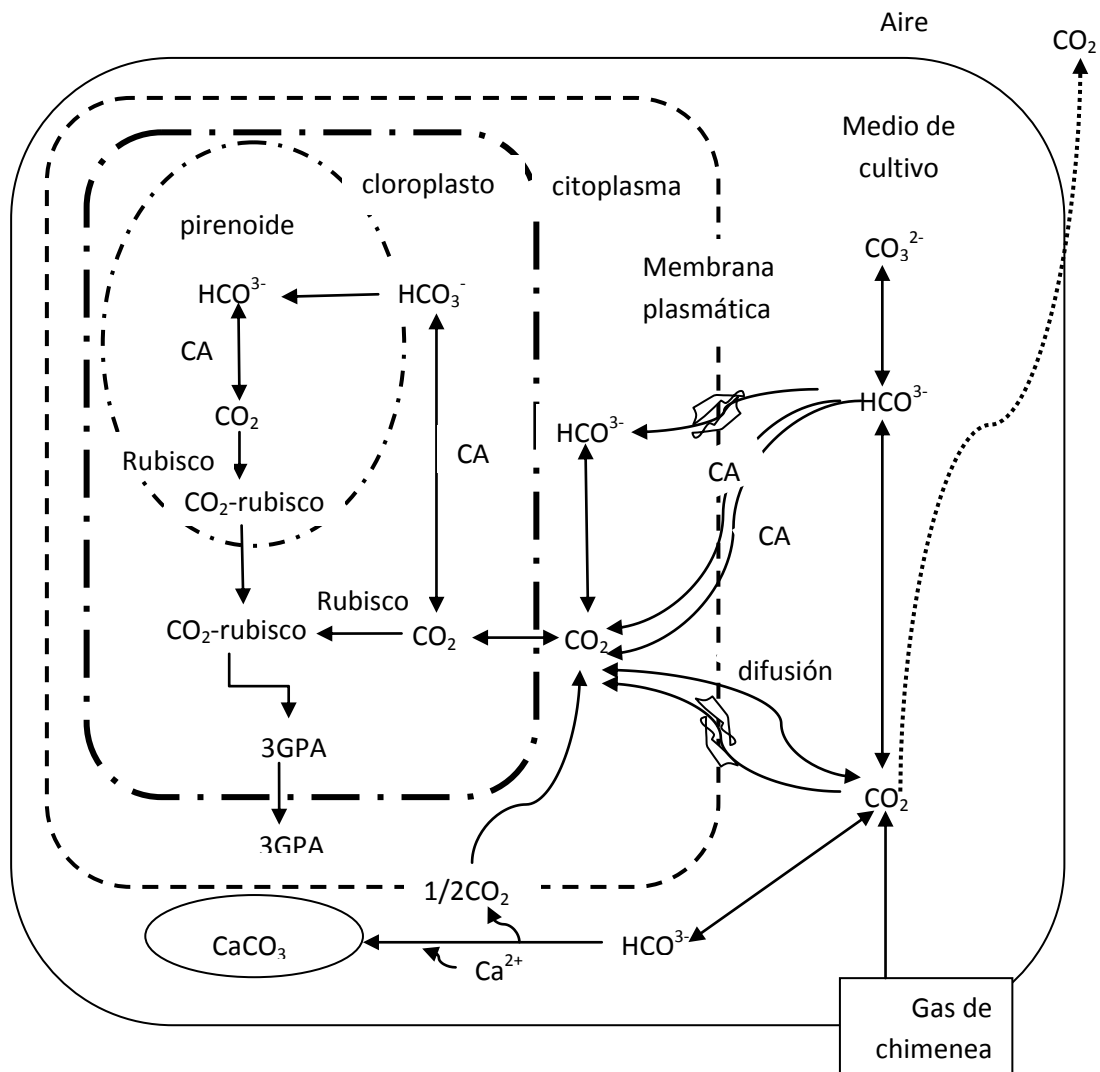


Figura 2. Modelos propuestos para el consumo de CO<sub>2</sub> por las microalgas (Jansson y Northen, 2010; Mikhodyuk *et al.*, 2008; Graham y Wilcox, 2000; Badger y Price, 2003)

Las microalgas pueden presentar calcificación, esto es, la formación de carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>), que también puede generar CO<sub>2</sub> de acuerdo a la Ecuación 10 (Jansson y Northen, 2010).



A valores de pH entre 8 y 10, la calcificación puede proceder sin generar CO<sub>2</sub> de acuerdo a la Ecuación 11 (Jansson y Northen, 2010).

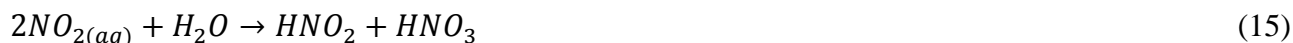
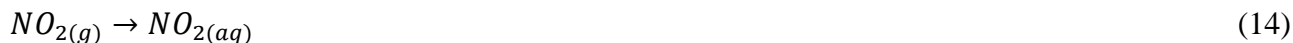


En algunas investigaciones como en la de Anjos *et al.* (2013), se demostró que la máxima velocidad de fijación de CO<sub>2</sub> (2.22 g l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) se obtuvo utilizando 6.5% de CO<sub>2</sub> y una velocidad de aireación de 0.5 vvm, después de 7 días de cultivo a 30°C. Para esto, cultivaron a la microalga *Chlorella vulgaris* P12 en fotobiorreactores de columna de burbujeo bajo concentraciones de CO<sub>2</sub> de 2 – 10% y velocidades de aireación de 0.1 a 0.7 vvm.

## 2.5.2 Óxidos de Nitrógeno

### 2.5.2.1 Solubilidad de los NO<sub>x</sub> en soluciones acuosas

En general, las especies de NO<sub>x</sub> emitidas de los procesos de incineración consisten generalmente del 95% de NO y 5% de NO<sub>2</sub> (Wang *et al.*, 2008). El gas incoloro NO, es pobremente soluble en agua (0.0068 g l<sup>-1</sup> a 1 atm y 25°C) (Perry y Chilton, 1973). Cuando cualquiera de estos NO<sub>x</sub> se disuelve en agua, forman el ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) o el ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>) de acuerdo a las Ecuaciones 12 a 16 (Stumm y Morgan, 1981):



En los reactores de microalgas, el pH es normalmente mayor a 4, y el HNO<sub>3</sub> y el HNO<sub>2</sub> están principalmente en forma iónica como nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), respectivamente (Ecuaciones 17 y 18) (Stumm y Morgan, 1981)



También, el medio contiene oxígeno, y el NO y el NO<sub>2</sub> pueden reaccionar como sigue:



### 2.5.2.2 Consumo de NO<sub>x</sub> por las microalgas

En general, las microalgas pueden consumir el nitrógeno en varias formas: amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO y N<sub>2</sub> (Figura 3). En 1997 Nagase *et al.* encontraron que la presencia de oxígeno incrementaba la remoción de NO en los reactores de microalgas. Sin luz, y en ausencia de O<sub>2</sub>, no ocurre la remoción de NO. También sugirieron que con la luz, el NO se disuelve primero en el agua, después de lo cual es oxidado y asimilado por la biomasa de las microalgas, teniéndose las siguientes ecuaciones:

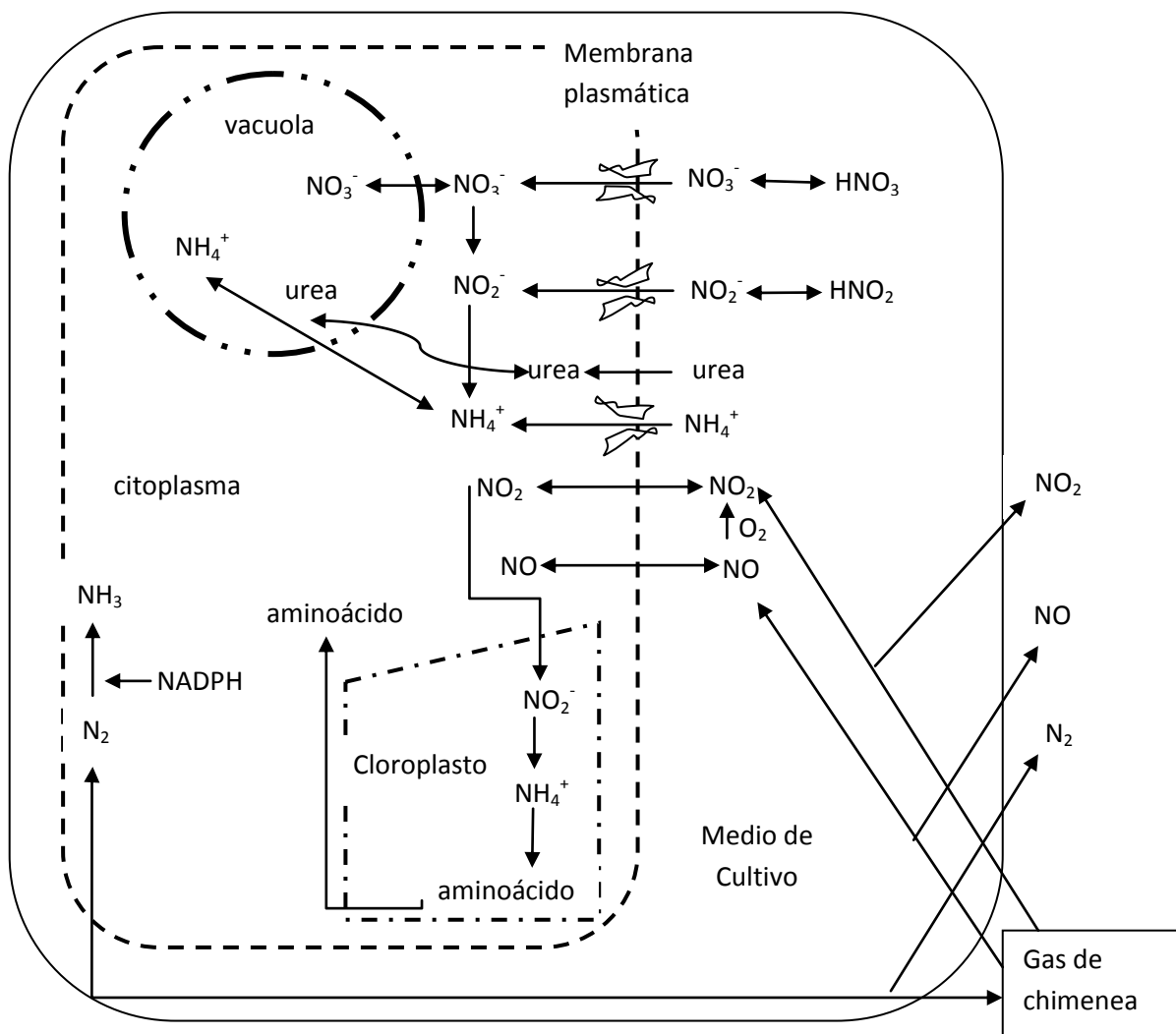


Figura 3. Metabolismo del N<sub>2</sub>, NO y NO<sub>2</sub> en las microalgas (Nagase *et al.*, 2001; Graham y Wilcox, 2000; Stum y Morgan, 1981)

Brown (1996) reportó que adicionando NO a un cultivo de la microalga *Monoraphidium minutum* se obtenía una doble concentración de nitrito y se retrasaba la utilización del nitrato en la curva de crecimiento. Esto implicó que algo del NO disuelto estaba disponible como fuente de nitrógeno para la microalga.

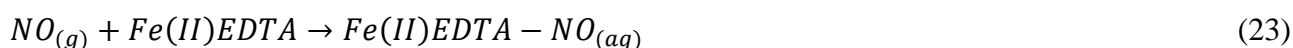
En otro estudio, Nagase *et al.* (2001) concluyeron que un poco de NO fue oxidado en el medio antes de que fuese consumido por las algas y que el NO siendo una pequeña molécula no polar, se sugiere que se puede difundir a través de las membranas celulares. Además concluyeron que el NO fue utilizado preferentemente como fuente de nitrógeno para el crecimiento de la microalga más que el nitrato.

Las microalgas también pueden producir y emitir NO. En muchas especies de microalgas, este NO se produce si el nitrato está presente y el amonio ausente, y es mediado por la enzima nitrato reductasa (Mallick *et al.*, 1999).

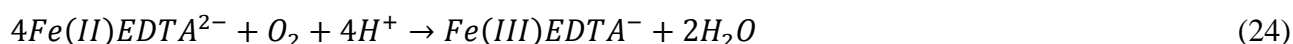
### 2.5.2.3 Remoción del NO por las microalgas

El paso limitante para la remoción de NO en los sistemas de reacción es su disolución en el medio de cultivo de microalgas. Jin *et al.* (2008) demostraron que la adición de un agente secuestrante mejoraba la remoción del NO en un cultivo de una microalga del género *Scenedesmus*, y concluyeron que el agente secuestrante hacía que el NO fuera más soluble en el medio.

Agentes secuestrantes bien conocidos que pueden formar complejos metálicos son el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido nitrilotriacético (NTA) y el ácido metilaminodiacético (MIDA). Particularmente, el complejo ácido etilendiaminotetraacético-ferroso (Fe(II)EDTA) reacciona rápidamente con el gas NO para formar un complejo metálico- nitrosil estable, como se muestra en la siguiente ecuación:



Los cultivos de microalgas y los gases de chimenea contienen oxígeno disuelto, por lo que el Fe(II)EDTA es fácilmente oxidable a complejo ácido etilendiaminotetraacético-férrico (Fe(III)EDTA) (Jin *et al.*, 2008) de acuerdo a la Ecuación 24. Ya que el Fe(III)EDTA no puede secuestrar NO, esto disminuye la eficiencia del proceso.



### 2.5.3 Óxidos de Azufre

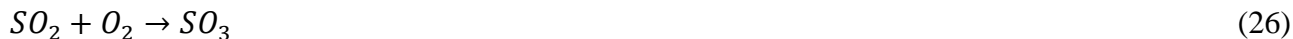
#### 2.5.3.1 Solubilidad del SO<sub>2</sub> en soluciones acuosas

El SO<sub>2</sub> es un gas incoloro con una elevada solubilidad en agua (22.971 g por cada 100 g de H<sub>2</sub>O a 0°C) (Weil y Sandler, 1997). Después de que el SO<sub>2</sub> se disuelve en agua, forma una solución acuosa ligeramente ácida de ácido sulfuroso (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) (Stumm y Morgan, 1981) de acuerdo a la siguiente ecuación:



Esta acidez se debe a la formación y la subsecuente ionización del H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. La principal forma es el ion sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) a pH de 6 o superior; el ion bisulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) se encuentra a pH de 2 a 6 (Stumm y Morgan, 1981).

El trióxido de azufre (SO<sub>3</sub>) también puede estar presente en el gas de chimenea (2 a 4% del azufre contenido en el gas, (Niessen, 2002). El SO<sub>3</sub> reacciona rápidamente con el agua para formar ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Este último también se puede formar a partir de la oxidación del H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Ecuaciones 26 a 28).



#### 2.5.3.2 Consumo y metabolización del SO<sub>2</sub> por las microalgas

El azufre, un componente esencial de los aminoácidos cisteína y metionina, y de los lípidos de los tilacoides, es indispensable para el crecimiento de las microalgas (Graham y Wilcox, 2000). Las algas de agua dulce contienen alrededor del 0.15 a 1.96% de azufre por gramo de peso seco (Blaker *et al.*, 1989). Las microalgas adquieren azufre tomando sulfato dentro del citoplasma, por ejemplo, mediante sistemas de transporte de elevada afinidad con el sulfato (Giordano *et al.*, 2005<sub>a</sub>) de acuerdo a lo que se presenta en la Figura 4.





### 2.5.3.3 Efectos del SO<sub>2</sub> en las microalgas

El pH y la concentración de sulfito, juegan un papel importante en la tolerancia de la microalga al SO<sub>2</sub>. Los efectos bioquímicos del SO<sub>2</sub> surgen a partir de su habilidad para actuar como agente reductor u oxidante. Yang *et al.* (2004) reportaron que a bajas concentraciones (< 104 mg bisulfato de sodio L<sup>-1</sup>) el bisulfito era utilizado como fuente de azufre por la microalga *Botryococcus braunii* después de su oxidación a sulfato, pero elevadas concentraciones de bisulfito, eran tóxicas. Se sugirió que en la conversión de bisulfito a sulfato, se formaron aniones de superóxido, radicales hidroxilo y peróxido. Estas especies altamente oxidativas, dañan las membranas y los pigmentos, ocasionando peroxidación de los lípidos de membrana y la decoloración de la clorofila II, inhibiendo el crecimiento de *B. braunii* (Giordano *et al.*, 2005<sub>a</sub>).

Se han evaluado varias estrategias para disminuir la toxicidad del SO<sub>2</sub> suministrado a las microalgas. Por ejemplo, mantener el pH arriba de 6 para prevenir la formación de sulfitos, por la adición de soluciones alcalinas, ha sido exitoso (Lee *et al.*, 2000), o utilizando especies acidofílicas tales como *Galdiera partita* (Kurano *et al.*, 1995).

## 2.6 Factores que Modifican el Proceso de Fijación de CO<sub>2</sub> por microalgas

### 2.6.1 Temperatura

La temperatura del gas de combustión emitido de las plantas termoeléctricas está alrededor de 120°C, la factibilidad de fijar CO<sub>2</sub> por las microalgas, proveniente de los gases de combustión depende que se haya instalado un sistema de intercambio de calor o utilizar especies termofílicas. Se han identificado muchas especies que pueden tolerar elevadas temperaturas, incluso arriba de 60°C.

Miyairi (1995) utilizó un cultivo de la cianobacteria *Synechococcus elongates*, y burbujeó CO<sub>2</sub> a diferentes concentraciones, produciéndose una disminución del pH a 52°C con 60% de CO<sub>2</sub> que fue similar a una caída del pH a 25°C con 20% de CO<sub>2</sub>, lo que sugiere que la solubilidad del CO<sub>2</sub> a cierta temperatura da una ventaja a *S. elongates*, de tolerar mayores concentraciones de CO<sub>2</sub>.

### **2.6.2 pH**

El pH del medio de cultivo se puede ver influido por CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> y los SO<sub>x</sub> disueltos provenientes del gas de combustión. Se ha observado que con elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub>, el pH cae hasta un valor de 5, y con concentraciones de SO<sub>2</sub> elevadas, incluso ha llegado a caer hasta el valor de 2.6. Mientras el cambio de pH se deba al CO<sub>2</sub>, éste tiene un efecto menor en el crecimiento del alga, el fuerte cambio de pH ocasionado por los SO<sub>x</sub> puede inhibir todo crecimiento (Maeda *et al.*, 1995; Westerhoff *et al.*, 2010).

Jiang *et al.* (2013) reportaron que con la adición de CaCO<sub>3</sub>, la microalga *Scenedesmus dimorphus* pudo tolerar concentraciones de CO<sub>2</sub>, NO y SO<sub>2</sub> de 10 – 20%, 100 – 500 ppm y 100 ppm, respectivamente, además de que se pudo mantener el pH alrededor de 7.

### **2.6.3 Intensidad de Luz**

Para la fijación de CO<sub>2</sub> y la producción de biomasa, es necesaria una intensidad de luz óptima. La luz se convierte en el factor limitante para la productividad de las microalgas. Las plantas y las microalgas tienen dos fotosistemas: el fotosistema I con un pico de absorción a 680 nm y el fotosistema II con un pico de absorción a 700 nm. Se ha reportado (Rubio *et al.*, 2003), que una exposición de las células a largos periodos con elevada intensidad de luz ocasiona fotoinhibición debido al daño del fotosistema II, conduciendo a una inactivación de otros sistemas incluyendo los sistemas evolutivos de oxígeno y los acarreadores de electrones.

La intensidad de la luz al fondo de una densa suspensión de algas se reduce enormemente debido a la absorción y a la dispersión de la luz. La atenuación de la intensidad de luz es dependiente de su longitud de onda, la concentración celular, la distancia de penetración de la luz y la geometría del fotobiorreactor. Fernandes *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la geometría circular y plana de los fotobiorreactores sobre la penetración de luz y encontraron que para concentraciones similares de células de microalgas, la geometría circular permite una mejor penetración de luz que la geometría plana, sin embargo, la geometría plana ayuda a una distribución uniforme de la luz.

La intensidad de luz de saturación ( $I_s$ ) es uno de los parámetros que determina la eficiencia de la utilización de la luz y sobre todo la eficiencia fotosintética. Si los pigmentos presentes en el fotosistema están sobrecargados con la luz entrante se interrumpe la síntesis y degradación del sistema de captación de luz. Esto resulta en la producción de especies oxigénicas reactivas, causando fotoinhibición y/o muerte foto oxidativa (Torzillo *et al.*, 2003). La intensidad de luz de saturación varía entre los 140-210  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con una buena estimación. Por ejemplo, de acuerdo a Hanagata *et al.*, 1992, la  $I_s$  para *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* está alrededor de 200  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## 2.7 Tipos de biorreactores más utilizados en el cultivo de microalgas

La mayoría de los biorreactores para la producción de microalgas se basan en cultivos suspendidos. Éstos incluyen las lagunas abiertas y los reactores cerrados. Dentro de los reactores cerrados principalmente se encuentran los reactores tubulares, de columna de burbujeo y los reactores *Airlift* (Christenson y Sims, 2011).

### 2.7.1 Estanques de algas de alta tasa

Los sistemas de producción a gran escala más comunes y que están en práctica son los estanques de algas de alta tasa, también conocidos como HRAPs por sus siglas en inglés. En uso desde 1950, los HRAPs son estanques abiertos y poco profundos provistos de una rueda de paletas que sirve para proporcionar la circulación de las algas y sus nutrientes. Estos estanques son de construcción simple, tienen bajos costos de operación y son fáciles de mantener, pero frecuentemente experimentan baja productividad debido a contaminación, pobre mezclado, zonas oscuras y una ineficiente utilización de  $\text{CO}_2$  (Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010).

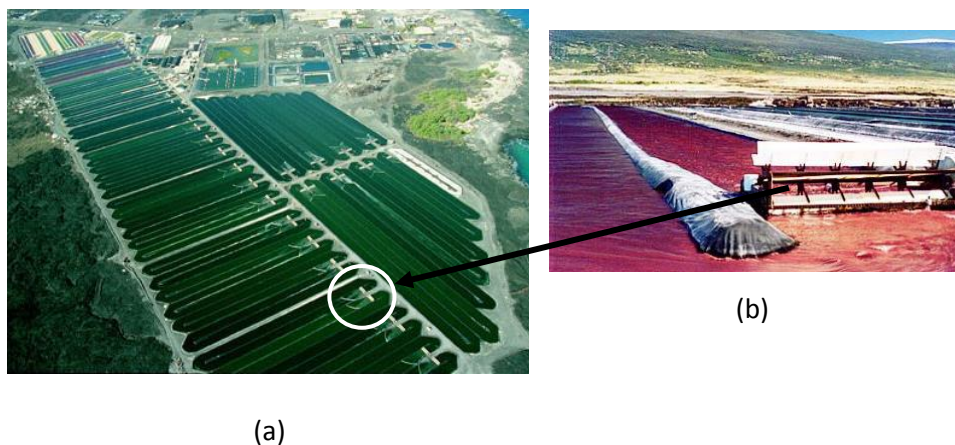


Figura 5. a) Estanque de algas de alta tasa (HRAP) y b) rueda de paletas que proporciona el mezclado al HRAP (Chisti, 2013)

### 2.7.2 Fotobiorreactor tubular horizontal

Los reactores tubulares horizontales están colocados horizontalmente mostrando un diseño de un conjunto de tubos paralelos o de circuito. Su forma tiene la ventaja, si se ocupa un cultivo al aire libre, de dirigir su orientación hacia la luz del sol, resultando en una elevada eficiencia de conversión. El gas es introducido dentro del tubo de conexión mediante un intercambiador de gases. Para mantener la temperatura de estos sistemas y evitar que por exposición al sol, lleguen a evaporarse o enfriarse de una manera drástica, se han desarrollado varios métodos, tales como, el dispersar agua en la superficie de los tubos, cubrirlos, o colocarlos dentro de una piscina de temperatura controlada (Posten, 2009).



Figura 6. Sistema de fotobiorreactores tubulares horizontales (Chisti, 2013)

### 2.7.3 Fotobiorreactor vertical tubular

Este tipo de biorreactor consiste de un tubo vertical que es transparente para permitir la penetración de la luz. Un dispersor se encuentra fijo en el fondo del reactor, el cual convierte el gas disperso en pequeñas burbujas de gas. La dispersión con gas provee todo el mezclado, la transferencia másica del  $\text{CO}_2$  y también remueve el  $\text{O}_2$  producido durante la fotosíntesis. Los fotobiorreactores verticales tubulares se pueden dividir en columnas de burbujeo y reactores *Airlift*, basados en la forma en que el líquido fluye (Kummar *et al.*, 2011).

### 2.7.3.1 Fotobiorreactor de columna de burbujeo

Los reactores de columna de burbujeo son recipientes cilíndricos con la altura de mínimo dos veces más grandes que el diámetro. Tiene la ventaja de bajo costo, elevada área superficial en razón al volumen, carencia de partes móviles, transferencia satisfactoria de calor y masa, eficiente liberación de O<sub>2</sub> y gas residual. El mezclado y la transferencia másica de CO<sub>2</sub> se hace a través del burbujeo del gas que proviene de un dispersor (Doran, 1995). La luz es provista externamente.



Figura 7. Fotobiorreactores de columna de burbujeo (Chisti, 2013)

### 2.7.3.2 Fotobiorreactor *Airlift*

Los reactores *Airlift* son recipientes con dos zonas interconectadas. Una de las zonas es llamada “riser” donde la mezcla gaseosa es dispersada mientras que la otra región es llamada “downcomer”, la cual no recibe el gas (Figura 8). Generalmente existen en dos formas: de circuito interno y de circuito externo. En los reactores de circuito interno, las regiones están separadas entre ellas por un tubo de aspiración o un deflector mientras que en los de circuito externo, el riser y el downcomer están separados físicamente por dos diferentes tubos. El mezclado es hecho por burbujeo del gas a través de un dispersor en el riser. (Kumar *et al.*, 2011).

Los reactores *Airlift* han sido exitosamente empleados en muchos tipos de bioprocesos, tales como, en el cultivo de levaduras, fermentaciones de hongos filamentosos, cultivos inmovilizados de enzimas, cultivos de microalgas y en el tratamiento de aguas residuales (Chisti, 1989).

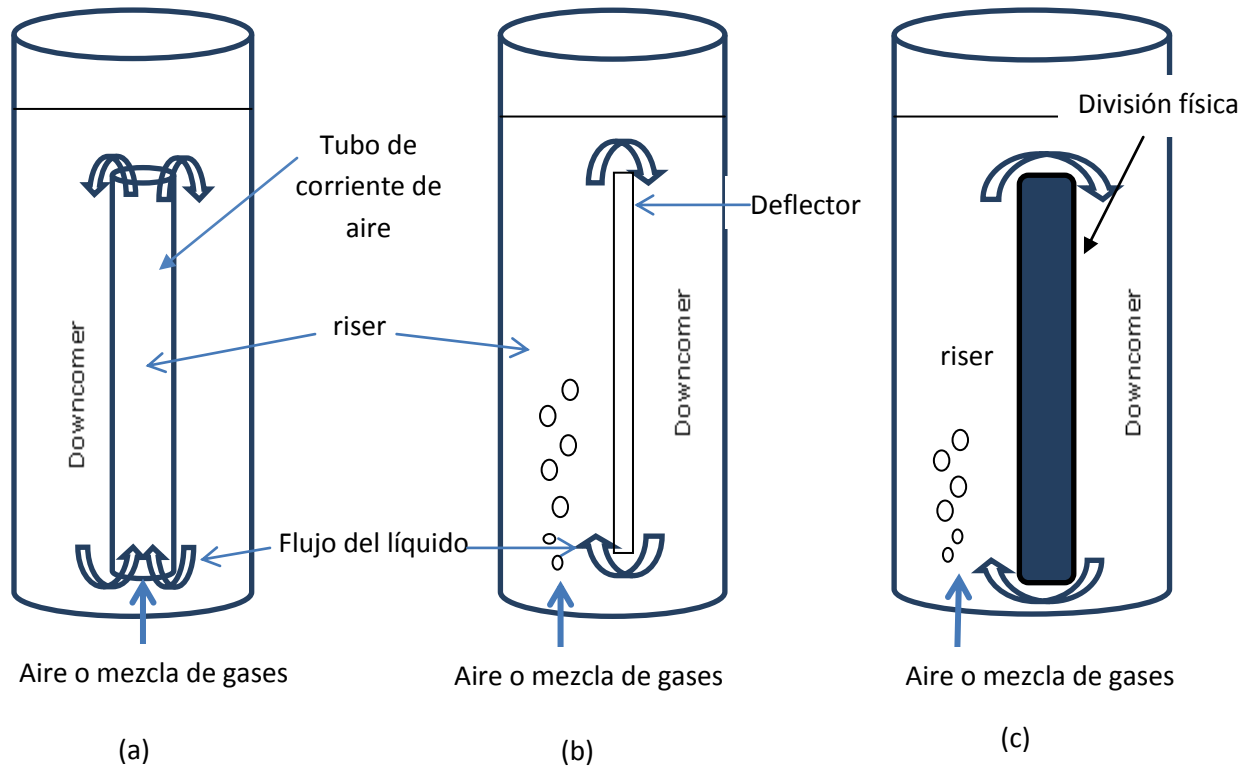


Figura 8. Diagrama de las diferentes configuraciones de los biorreactores *Airlift*. a) se muestran los dos circuitos, b) circuito interno y c) circuito externo (Chisti, 1989)

Degen *et al.* (2001) desarrollaron un fotobiorreactor *Airlift* plano con varias etapas de recirculación para el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*. El biorreactor expuso las células a luz intermitente para mejorar la eficiencia de utilización de luz a través del efecto flash. Durante los cultivos por lote, la productividad de biomasa fue 1.7 veces mayor que en una columna de burbujeo convencional de idénticas dimensiones. Una reducción en el camino de la luz de 30 a 15 mm incrementó la productividad de biomasa 2.5 veces. Se obtuvo una productividad máxima de  $0.11 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  con una iluminación artificial de  $980 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

## 2.8 Modelado del crecimiento de microorganismos

La investigación del comportamiento cinético de un microorganismo en un biorreactor se puede llevar a cabo mediante el empleo de modelos. Estos deben derivarse de teorías bien establecidas y describirse en términos matemáticos de tal forma que se expresen como ecuaciones de trabajo para el proceso (Galíndez y Ruiz, 1994).

Una etapa esencial en el desarrollo de cualquier modelo es la formulación adecuada de las ecuaciones de balance de masa y energía. A éstas deben agregarse las ecuaciones cinéticas de velocidad de crecimiento celular, de consumo de sustrato y/o formación de producto, las ecuaciones que representan velocidades de transferencia de calor y masa y ecuaciones que representan a los cambios propios del sistema. Dentro de las expresiones matemáticas más utilizadas para la descripción del crecimiento microbiano, se encuentra la ecuación de Monod (Ecuación 29), que nos relaciona la velocidad de crecimiento con el sustrato limitante (Galíndez y Ruiz, 1994).

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_s}{K_s + C_s} \quad (29)$$

Donde:

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento [ $h^{-1}$ ]  
 $\mu_{max}$  = Velocidad específica máxima de crecimiento [ $h^{-1}$ ]  
 $C_s$  = Concentración de sustrato limitante [g/L]  
 $K_s$  = Constante de Monod [g/L]

La velocidad con que mueren las células está dada por la Ecuación 30:

$$r_d = (k_d + k_t C_t) C_c \quad (30)$$

Ecuación de decaimiento celular (Fogler, 2001)

Donde

$C_t$  = concentración de una sustancia que es tóxica para la célula [g/L].  
 $K_d$  = constante de velocidad de fallecimiento natural [ $h^{-1}$ ]  
 $K_t$  = constante de velocidad de fallecimiento debida a una toxina [ $h^{-1}$ ].  
 $C_c$  = concentración celular [g/L]

### 2.8.1 Balance de biomasa

*Velocidad de acumulación de células = Velocidad neta de generación de células vivas*

(Ecuaciones 31 y 32)

(31)

$$V \left( \frac{dC_c}{dt} \right) = (r_g - r_d) V$$

$$r_g = \mu C_c \quad (32)$$

Sustituyendo la ecuación de Monod y la ecuación de muerte celular en el balance (Ecuación 33)

$$V \left( \frac{dC_c}{dt} \right) = \left[ \left( \frac{\mu_{max} C_s}{K_s + C_s} \right) C_c - (k_d + k_t C_t) C_c \right] V \quad (33)$$



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 MATERIALES Y EQUIPO

##### 3.1.1 Equipo experimental

Se instaló un equipo experimental que consta de 3 fotobiorreactores tipo *Airlift* de vidrio de 3.721 L de capacidad. Estos reactores se conectaron a una línea de aire y gases estériles. Para mantener los cultivos en agitación constante se utilizaron dispersores de aire hechos de vidrio sinterizado. El flujo de aire y de gases, fue controlado mediante válvulas de aguja y rotámetros. Los biorreactores se colocaron dentro de un compartimiento hecho de acrílico que sirve de material aislante, manteniéndolos a temperatura constante. Para conseguir la temperatura de 27°C, se utilizó un sistema de control de temperatura conectado a unas resistencias colocadas alrededor de cada fotobiorreactor. Para controlar el flujo de la salida de los gases, se utilizó una tubería de PVC. La luz fue provista por lámparas fluorescentes de 14 W que proporcionaron 1300 lux de intensidad (Olguín, 2013) (Figuras 9 y 10).

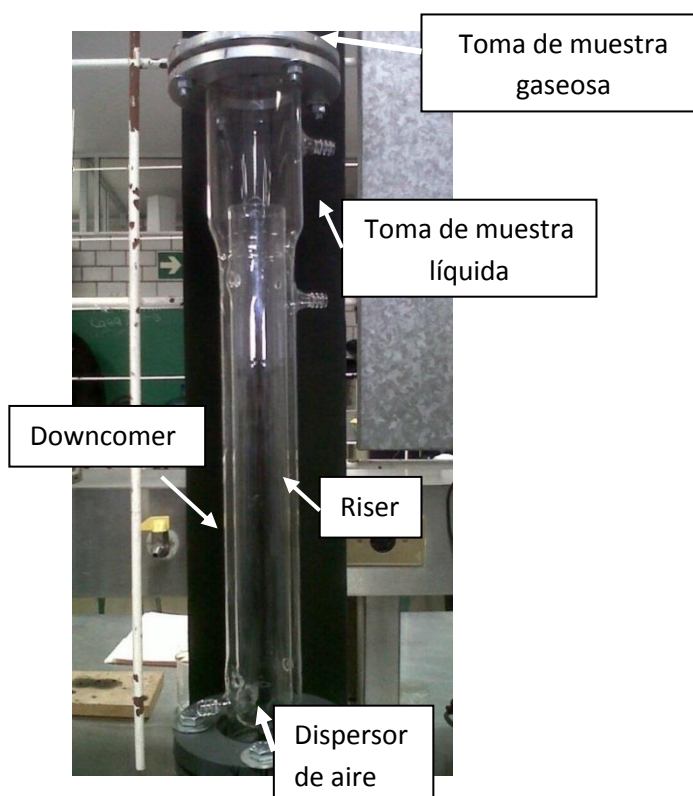


Figura 9. Fotobiorreactor tipo *Airlift* (modelo similar al de Galíndez y Ruiz, 1994)

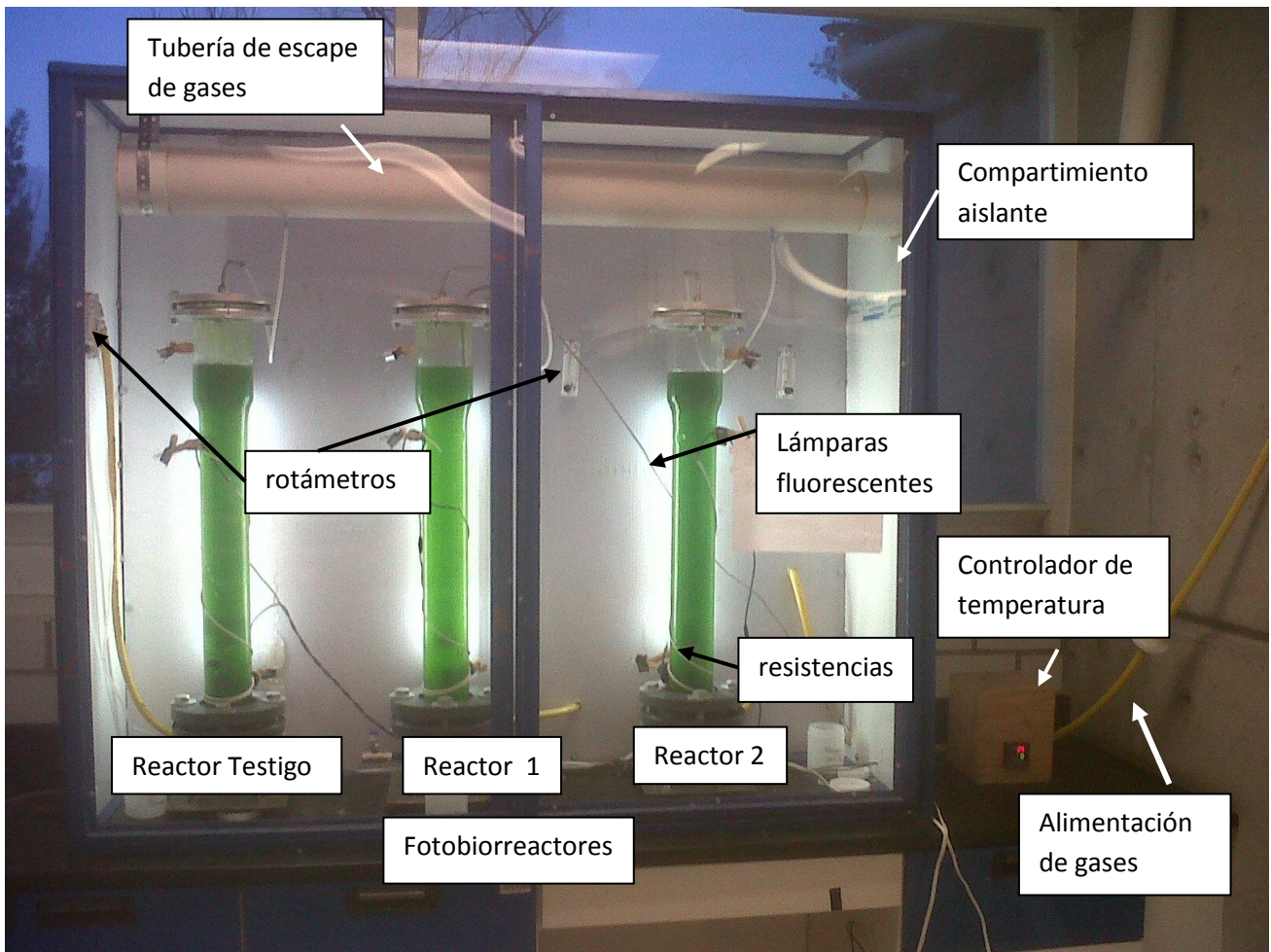


Figura 10. Equipo experimental

### 3.1.2 Microorganismo

#### 3.1.2.1 Aislamiento e Identificación del microorganismo

Se tomaron muestras de agua del lago de Chapultepec, localizado en la ciudad de México D.F., y se transportaron al laboratorio de Microbiología Ambiental de la UAM-Azcapotzalco. Para el aislamiento, se tomaron alícuotas de 1.0 ml y se sembraron en tubos de ensaye y matraces Erlenmeyer conteniendo el medio BG-11 (Jiang *et al.*, 2013) con el fin de propagar las células. Posteriormente, se procedió a su aislamiento en cajas Petri conteniendo el mismo medio BG-11, por el método de la estría cruzada. Las placas se incubaron a 28°C por 15 días, con luz continua y 1300 luxes de intensidad, provistos por lámparas fluorescentes de 8 W. Después del periodo de incubación, se seleccionaron las colonias aisladas de cada microalga para inocularse por separado tanto en tubos de agar inclinado como en medio líquido para preservarlas y proliferarlas.

Para la identificación de las microalgas aisladas, se utilizó un microscopio óptico adaptado con contraste de fases, lográndose diferenciar 3 tipos de microalgas, las cuales se identificaron como: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus dimorphus* y *Botryococcus braunii*, realizando la comparación de las micrografías con la base de datos obtenida de <http://www.algaebase.org> .

Para este estudio se utilizó *Scenedesmus dimorphus*, ya que se ha reportado (Jiang *et al.*, 2013) que tolera elevadas concentraciones de SO<sub>2</sub> y NO (100 y 500 ppm, respectivamente). A continuación, se observa la micrografía de *S. dimorphus* tomada con la técnica de contraste de fases, en el laboratorio de Microbiología Ambiental (Figura 11):

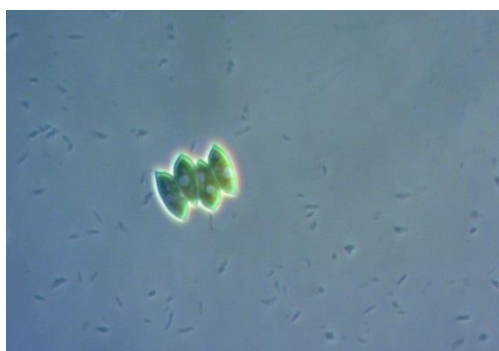


Figura 11. Micrografía de la microalga *Scenedesmus dimorphus*

### 3.1.2.2 Inóculo

Los fotobiorreactores se inocularon con una suspensión de la microalga *S. dimorphus* (Figura 12) desarrollada durante 15 días a 27°C, en medio de cultivo BG-11 (Jiang *et al.*, 2013), con un fotoperiodo de luz/oscuridad de 12 h y 1300 lux de intensidad de luz. El inóculo representó el 20 % (v/v) del volumen de operación del reactor (Olguín, 2013).



Figura 12. Inóculo de *Scenedesmus dimorphus*

### 3.1.3 Medio de Cultivo y Preservación de la cepa

Para el cultivo y preservación de la cepa *S. dimorphus*, se utilizó el medio BG-11, en medio acuoso y tubos de agar inclinado. El medio BG-11 contenía (mg/L): NaNO<sub>3</sub>, 1500; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 75; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 36; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20; Ac. Cítrico, 6; citrato de amonio férrico, 6; EDTA, 1; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2.86; MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 1.81; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0.39; ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.222; CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, 0.079; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.049 (Jiang *et al.*, 2013).

El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup> por 15 min, para finalmente ser inoculado en los biorreactores.

### 3.2 CULTIVO

Se llevaron a cabo cinco cultivos, en cuatro de ellos se observaron los efectos que tienen los gases CO<sub>2</sub>, NO y SO<sub>2</sub> sobre el crecimiento de la microalga *S. dimorphus* y se compararon con el cultivo donde no hubo presencia de los gases anteriores. Los cultivos se llevaron a cabo utilizando corrientes de gases constituidas por: aire del medio ambiente (A) conteniendo una baja concentración de CO<sub>2</sub> (0.038%), y cuatro mezclas de gases compuestas de acuerdo a la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de las diferentes mezclas de gases suministradas a los biorreactores

Mezcla	Gas				Nomenclatura
	Aire (%)	CO <sub>2</sub> (%)	NO (ppm)	SO <sub>2</sub> (ppm)	
1	88	12	----	----	(A+CO <sub>2</sub> )
2	87.99	12	100	----	(A+CO <sub>2</sub> +NO)
3	87.99	12	----	60	(A+CO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub> )
4	87.98	12	100	60	(A+CO <sub>2</sub> +NO+SO <sub>2</sub> )

El CO<sub>2</sub>, NO y SO<sub>2</sub> sustituyeron las fuentes de carbono, nitrógeno y azufre correspondientes al medio de cultivo BG-11 que se utilizó en estos experimentos.

El procedimiento de obtención de las mezclas gaseosas se encuentra en el Apéndice A. Cabe hacer mención que en el caso de los gases: NO y del SO<sub>2</sub> se obtuvieron en el laboratorio utilizando reacciones conocidas que generan dichos gases.

La velocidad de aireación fue de 0.2 vvm (Li *et al.*, 2011). Se utilizó un periodo de luz/oscuridad de 12 h y una intensidad de luz de 1300 lux (Olguín, 2013). Los cultivos fueron alimentados con las mezclas de gases, durante el periodo de luz, mientras que en la oscuridad, solo se utilizó aire (Radmann *et al.*, 2011). La temperatura se mantuvo a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y el pH se mantuvo a  $7 \pm 1$ . Los cultivos se llevaron a cabo por 30 días, tomándose muestra cada 24 h.

Con el fin de mantener el pH en niveles adecuados para el crecimiento del alga (pH entre 6-8) hubo la necesidad de adicionar pequeñas cantidades de NaOH en solución al 5% para los cultivos donde se adicione  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_2$  y NO. En el caso del cultivo de testigo, solo se adicionó aire y no se adicionaron estos gases. Debido a que se incremento el pH en este cultivo, se adicionó al reactor una solución de HCl 0.05N para ajustar el pH.

### **3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS**

#### **3.3.1 Análisis de $\text{CO}_2$ en la corriente gaseosa**

Para la determinación de  $\text{CO}_2$  en las corrientes de aire se utilizó un Cromatógrafo de gases Gow-Mac 550 con detector de conductividad térmica (TCD, por sus siglas en inglés). La columna de separación que se utilizó fue de sílica-gel de 18 pies por 1/8 pulg. de diámetro (Altech). Las condiciones de operación fueron: temperatura del inyector de  $56^{\circ}\text{C}$ , temperatura de la columna de  $50^{\circ}\text{C}$  y temperatura del detector de  $150^{\circ}\text{C}$ . El gas acarreador fue Nitrógeno, que fue administrado a un flujo de 30 mL/min. La cantidad de  $\text{CO}_2$  alimentado a los biorreactores, se determinó inyectando al cromatógrafo, muestras tomadas de la entrada de la fase gaseosa del sistema. Las lecturas obtenidas se interpolaron en una curva de calibración que correlaciona las unidades de área con las moles de  $\text{CO}_2$  gaseoso (Apéndices B y C).

#### **3.3.2 Determinación de Biomasa por Densidad Óptica**

La concentración de biomasa (g/L) se determinó midiendo la densidad óptica a 678 nm de longitud de onda, utilizando un espectrofotómetro visible Spectronic Instruments modelo 21D. Las lecturas obtenidas se interpolaron en una curva de calibración que relaciona la densidad óptica con el peso seco de *S. dimorphus* (Apéndice D). El peso seco de la microalga se midió filtrando alícuotas de 10 mL a través de filtros de Papel Watman No. CF/A de  $1.5 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Cada filtro se secó a  $50^{\circ}\text{C}$  hasta llegar a peso constante.

La relación entre la densidad óptica y la concentración de biomasa de *S. dimorphus* se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$y = 1.6795x + 0.0306 \quad (R^2 = 0.9995) \quad (34)$$

Donde  $y$  se refiere a la concentración de biomasa (g/L) y  $x$  a la densidad óptica ( $OD_{678}$ ).

### 3.3.3 Alcalinidad

Se determinó la alcalinidad por el método de titulación con una solución de HCl 0.05 N, con la finalidad de determinar la cantidad de carbón inorgánico disponible para la microalga (APHA, 1992) (Apéndice E).

#### Procedimiento

Se tomaron 10 mL de muestra líquida (previamente filtrada) de cada reactor, que se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 mL, y se diluyeron a un volumen aproximado de 50 mL. Después se agregaron 2 gotas de indicador de fenolftaleína y se tituló con una solución de HCl 0.05N hasta decoloración. Posteriormente, se agregaron 2 gotas de anaranjado de metilo en la misma muestra. Se valoró con el mismo ácido hasta obtener una coloración canela. Según el volumen de ácido gastado usando fenolftaleína y anaranjado de metilo se pueden identificar 5 casos diferentes de aniones presentes en las muestras (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación de aniones en la determinación de alcalinidad.

Caso	F* y A**	Iones encontrados	Y
1	F > A	OH <sup>-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	OH <sup>-</sup> = F - A CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> = 2A
2	F < A	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> = A - F HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = 2F
3	F = A	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	2F; 2A ; A+F
4	F = 0	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = A
5	A = 0	OH <sup>-</sup>	OH <sup>-</sup> = F

\*F = Volumen de HCl gastado utilizando Fenolftaleína

\*\*A = Volumen de HCl gastado utilizando Anaranjado de Metilo

Cálculos:

$$g \text{ anión} = (Y) (N) (pmeq) \quad (35)$$

Donde:

$Y$  = mL de HCl gastados

$N$  = normalidad del HCl

$Pmeq$  = peso mili equivalente del anión que se busca

### 3.3.4 Determinación de $\text{NO}_2^-$

La determinación de  $\text{NO}_2^-$  disueltos en el medio de cultivo se realizó mediante el método de Griess y la adición de  $\text{VCl}_3$  en solución acuosa. Este método se basa en la reducción del  $\text{NO}_3^-$  hacia la formación de  $\text{NO}_2^-$  en presencia de  $\text{VCl}_3$ . Una vez dado este proceso de reducción, se pueden medir los  $\text{NO}_2^-$  utilizando el reactivo de Griess (Miranda *et al.*, 2001) (Apéndice F).

#### Procedimiento

Se tomaron alícuotas de 1.0 mL de las muestras líquidas previamente filtradas, a las que se les adicionó 1.0 mL de reactivo  $\text{VCl}_3$ , se mezclaron y posteriormente se les adicionó 1.0 mL de reactivo de Griess. Las muestras se dejaron reposar por 15 minutos y se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Visible Spectronic Instruments modelo 21D.

### 3.3.5 Determinación de $\text{SO}_4^{2-}$

La determinación del ion  $\text{SO}_4^{2-}$  disuelto en el medio de cultivo se realizó mediante la medición de la turbidez de  $\text{BaSO}_4$  (APHA, 1992) (Apéndice G)

#### Procedimiento

Se tomaron 10 mL de muestra previamente filtrada y se aforaron a 100 mL con agua desionizada. Posteriormente, estos 100 mL se vaciaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se añadieron 20 mL de solución tampón (APHA, 1992) y se mezclaron. Mientras se estaba agitando, se añadieron 0.419 g de  $\text{BaCl}_2$  y se continuó agitando durante 1 minuto. Se midió la turbidez a los 5 minutos en un espectrofotómetro a 420 nm de longitud de onda.

### 3.4 Cálculos de Eficiencia de Utilización de CO<sub>2</sub> y Velocidad específica de Crecimiento Máxima

#### 3.4.1 Cálculo de la eficiencia de utilización de CO<sub>2</sub>

Para obtener de la eficiencia de utilización de CO<sub>2</sub> (Ec) se requirió calcular la productividad máxima de biomasa y la velocidad de fijación de CO<sub>2</sub>

La productividad máxima de biomasa de acuerdo a Jiang *et al.*, 2013 [g cel L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>] se calcula

$$Productividad\ máx = \frac{\Delta X}{\Delta t}, \text{ donde } \Delta X = X_{max} - X_0 \quad (36)$$

y  $\Delta t =$  tiempo de cultivo

Donde X = La concentración de biomasa [g L<sup>-1</sup>].

$\Delta X =$  (Concentración de biomasa Máxima) – (Concentración de biomasa Inicial)

t = Tiempo de cultivo [días]

$\Delta t =$  (Tiempo de cultivo para obtener la máxima biomasa)-(Tiempo de inicio del cultivo)

La velocidad de fijación de CO<sub>2</sub> (Fc) [gCO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>], representa la concentración de CO<sub>2</sub> que la microalga puede consumir por día y está dada por (Jiang *et al.*, 2013):

$$F_C = \frac{Productividad\ máx * 50\%}{12} * 44 \quad (37)$$

De acuerdo con Jiang *et al.* (2013) con *Scenedesmus dimorphus* el 50% de la biomasa seca (o productividad máxima) corresponde a carbón y por ello la relación de pesos moleculares de CO<sub>2</sub> a carbón (44 g/mol /12 g/atm) aparece en la ecuación.



La eficiencia de utilización de CO<sub>2</sub> es el porcentaje de CO<sub>2</sub> que la microalga consumió respecto del CO<sub>2</sub> que se suministró, y está dada por:

$$Ec = \frac{Fc}{Mc1+Mc2} * 100 \quad (38)$$

Donde *Mc1* y *Mc2* corresponden a la concentración de CO<sub>2</sub> (en g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) en la mezcla gaseosa y en el aire respectivamente (12% y 0.038% de CO<sub>2</sub>).

### **3.4.2 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\max}$ )**

La velocidad específica de crecimiento máxima se calculó mediante regresión exponencial de la parte logarítmica del gráfico de concentración de biomasa contra tiempo (Moraris y Costa, 2007).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Efecto de la adición de CO<sub>2</sub> en el crecimiento de biomasa

La concentración inicial de inóculo fue alrededor de 0.15 g/L dependiendo del experimento y el pH del cultivo fue regulado a 6 y 8. El crecimiento de *S. dimorphus* cambió dependiendo de la adición de CO<sub>2</sub> gaseoso, así se encontró que en el caso en que se suministró aire del medio ambiente (0.038% concentración de CO<sub>2</sub>) se alcanzó una concentración de biomasa de 0.5 g/l (Figura 13), mientras que el cultivo donde se adicionó 12% CO<sub>2</sub> en la corriente gaseosa, las células mostraron un mayor crecimiento, llegando a 0.73 g/L de biomasa. También, podemos identificar diferencias en los períodos de crecimiento de la biomasa (Figura 13). Se observa una corta y baja fase de crecimiento exponencial en el cultivo suministrado solo con aire (A), mientras que en el cultivo suministrado con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>) la fase de crecimiento exponencial fue más prolongada y de mayor producción de biomasa que la anterior.

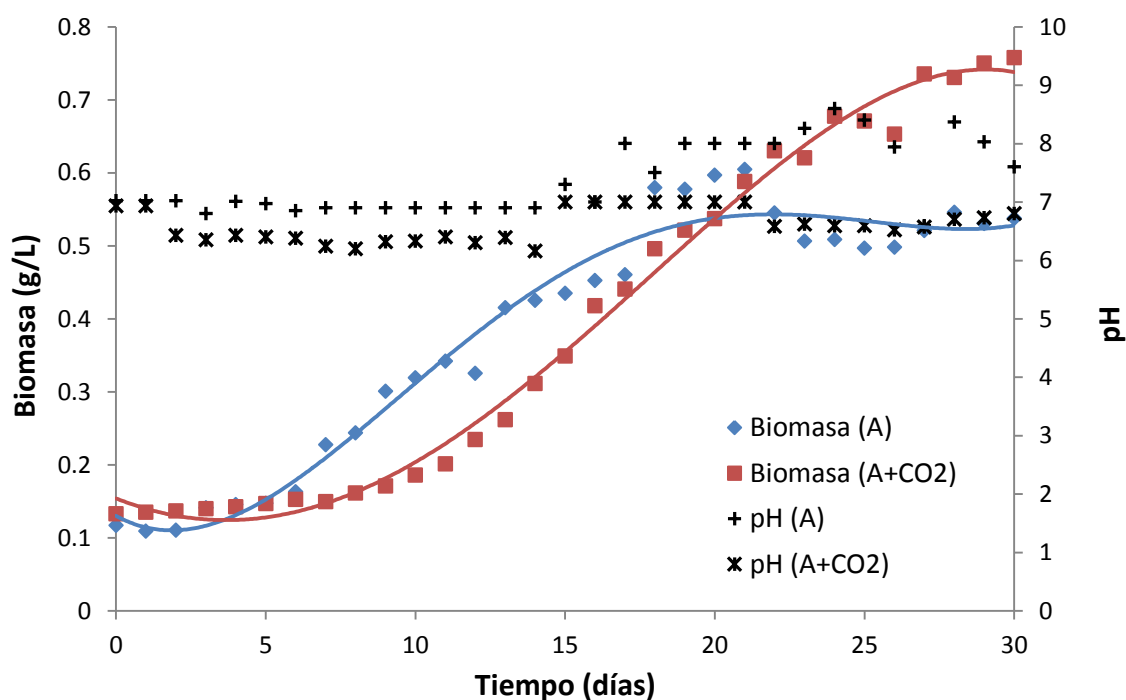


Figura 13. Crecimiento de *S. dimorphus* con suministro de aire (A) y con mezcla gaseosa (A+CO<sub>2</sub>)

## 4.2 Efecto de la adición de NO en el crecimiento de biomasa

El efecto más importante en estos experimentos fue que la presencia de NO en la fase gaseosa produjo mayor cantidad de biomasa respecto del experimento en donde no se adicionó NO.

Cuando se alimentó el cultivo con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>+NO) se encontró una concentración máxima de biomasa de 0.77 g/L (Figura 14) y cuando se alimentó con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>) se encontró una concentración máxima de biomasa de 0.73g/L. Para esto, los dos cultivos se alimentaron con 12% CO<sub>2</sub>, y como fuente de nitrógeno se utilizaron los nitratos en solución (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en el cultivo (A+CO<sub>2</sub>) y 100 ppm NO en el cultivo (A+CO<sub>2</sub>+NO).

En la Figura 14, se observa que las células en el cultivo alimentado con la mezcla gaseosa (A+CO<sub>2</sub>+NO) mostraron un rápido crecimiento, mientras que cuando se alimentó con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>) la microalga solo pudo disponer de los nitratos en solución (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y el crecimiento fue más lento.

Este comportamiento se llevo a cabo con la ausencia de una fase de adaptación para el cultivo con NO, gaseoso, mientras que para el cultivo que pudo disponer de nitratos en solución (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), dicha fase se prolongó hasta 8 días. Así mismo se observa que la pendiente de la fase de crecimiento exponencial es más pronunciada en el cultivo con NO gaseoso. Esto sugiere que la microalga *S. dimorphus* puede utilizar el NO como fuente de nitrógeno, lo que coincide con lo reportado por Jiang *et al.* (2013) y Kumar *et al.* (2010).

Por otra parte, Nagase *et al.* (2001) estudiaron las vías de consumo del NO en un cultivo con suministro continuo de este gas utilizando la microalga *Dunaliella tertiolecta* y encontraron que una pequeña porción de NO era oxidada en el medio de cultivo antes de su consumo por las células de la microalga y que la mayoría del NO permeaba directamente dentro de las células por difusión. Así, la microalga puede incorporarlo rápidamente a sus células, favoreciendo su crecimiento. Los mismos autores estudiaron el consumo de NO gaseoso comparado con el consumo de nitratos en solución NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Para esto se llevaron a cabo dos cultivos con suministro continuo de NO gaseoso y nitratos en solución NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Ellos encontraron que la cantidad de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> consumida fue menor que la cantidad de NO. Así, llegaron a la conclusión de que el NO es preferentemente utilizado como fuente de nitrógeno más que el nitrato, el cual es una de las fuentes de nitrógeno generales contenidas en el medio de cultivo convencional.

Por otro lado, se observa en el experimento que se alimentó con mezcla gaseosa (A+CO<sub>2</sub>+NO) un decaimiento en la concentración celular, cuando el cultivo con NO llega a una fase estacionaria mínima a los 21 días (Figura 14). La poca solubilidad del NO en el medio de cultivo (0.0068 g/L, a 25°C y 1 atm, Perry y Chilton, 1973), da como consecuencia que dicho gas se encuentre en una baja concentración, que no sea la adecuada para mantener el crecimiento celular.

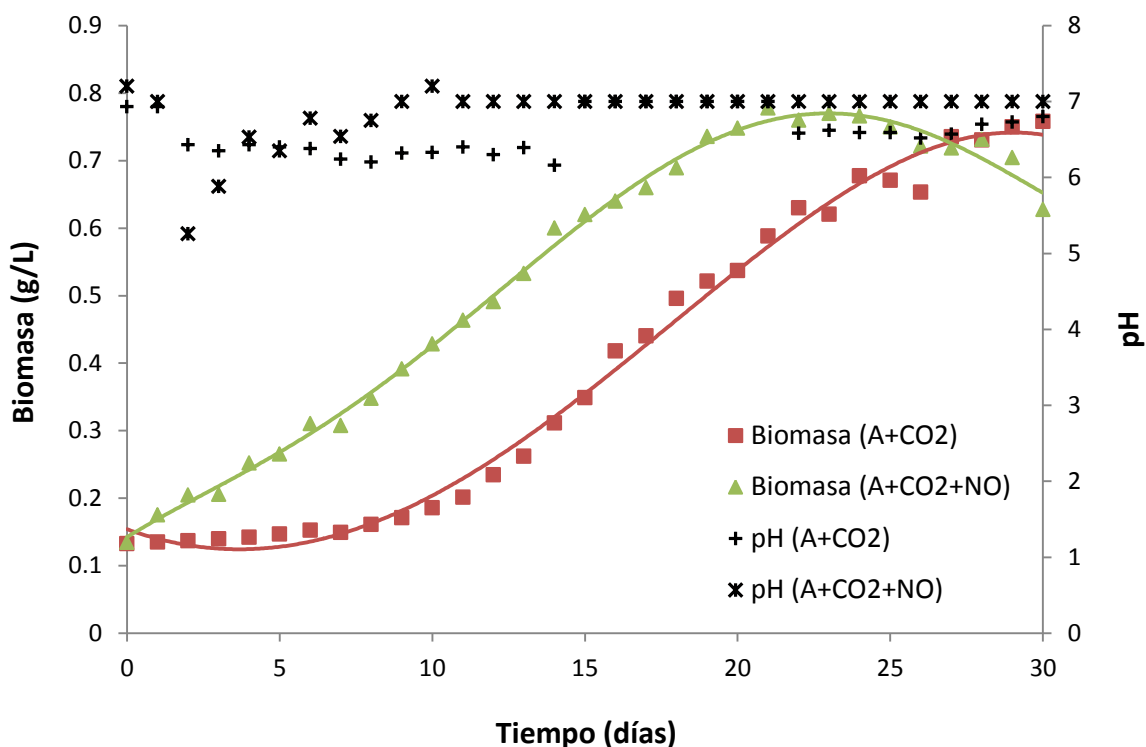


Figura 14. Crecimiento de *S. dimorphus* con suministro de las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO).

### 4.3 Efecto de la adición de SO<sub>2</sub> en el crecimiento de biomasa

El efecto más importante que se observó cuando se adicionó SO<sub>2</sub> gaseoso en los cultivos consistió en que el crecimiento de la biomasa a los 30 días disminuye, además se observó una fase estacionaria prolongada con un poco de crecimiento celular (Figura 15).

Se observó que la biomasa en el cultivo suministrado con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) mostró un rápido crecimiento, mientras que el crecimiento del cultivo cuando se alimentó con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>), fue más lento, con una fase de adaptación.

Este comportamiento se corrobora por la presencia de una corta fase de adaptación para el cultivo donde se alimentó con mezcla gaseosa (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>), mientras que para el cultivo donde se alimentó mezcla (A+CO<sub>2</sub>) esta fase se prolongó aproximadamente 8 días.

También se observa la fase exponencial del cultivo con SO<sub>2</sub>, muy pronunciada en los primeros 9 días y comienza a disminuir entre los 10 y 15 días y finalmente llega a su fase estacionaria a partir del día 20. Mientras que en el cultivo alimentado con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>) el crecimiento celular se mantuvo en la fase exponencial hasta el día 26 y comenzó la fase estacionaria después del día 30. Se puede decir que *S. dimorphus* toleró la adición continua de SO<sub>2</sub> en los primeros días, además de que pudo incorporarlo a sus células rápidamente. Sin embargo, después del 15° día de cultivo, ya no pudo tolerarlo. Este comportamiento probablemente se puede explicar debido a que en la conversión de sulfito a sulfato existe la formación de aniones de superóxido, radicales hidroxilo, y peróxidos. Estas especies altamente oxidativas, dañan las membranas y los pigmentos, ocasionando peroxidación de los lípidos de membrana y la decoloración de la clorofila II, inhibiendo el crecimiento de la microalga (Giordano *et al.*, 2005<sub>a</sub>). La presencia de sulfitos se debe a la formación de ácido sulfuroso derivado de la disolución de SO<sub>2</sub> en agua (Stumm y Morgan, 1981), de acuerdo a la siguiente reacción:

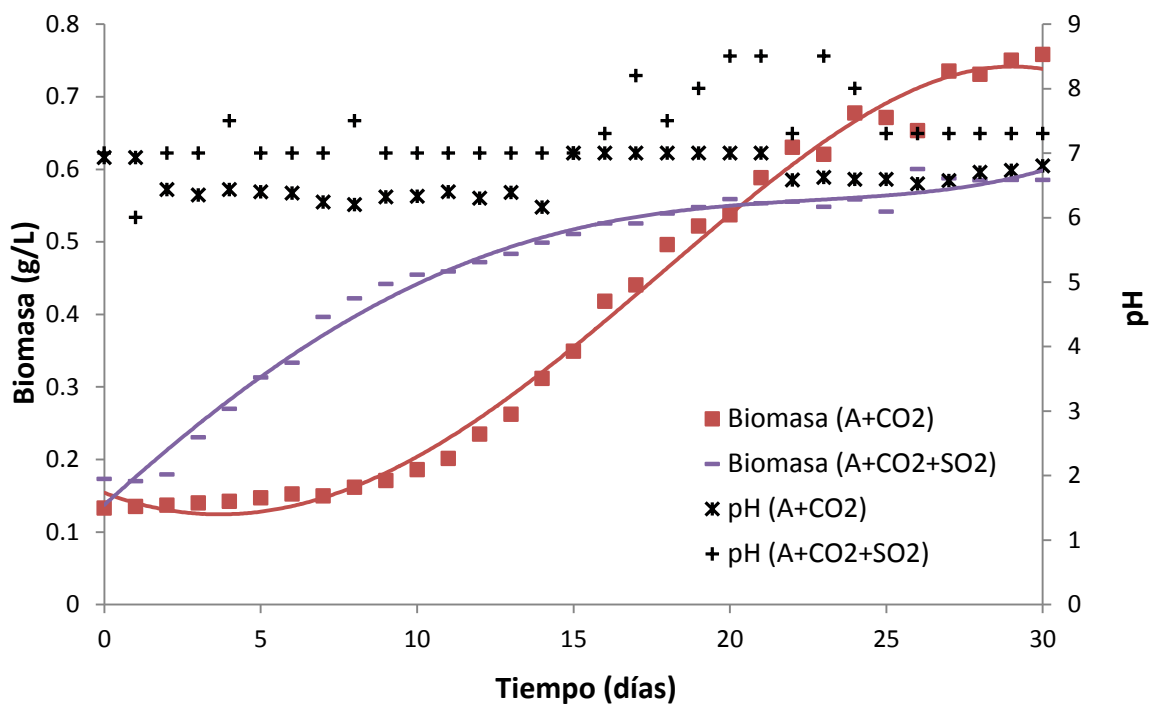


Figura 15. Crecimiento de *S. dimorphus* con suministro de las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>)

#### 4.4 Efecto de la adición simultánea de NO y SO<sub>2</sub> en el crecimiento de biomasa

El efecto más importante cuando se alimenta la mezcla de gases (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>) respecto del cultivo cuando se alimenta con la mezcla de gases (A+CO<sub>2</sub>+NO), es que la presencia de SO<sub>2</sub> disminuye la producción de biomasa desde 0.77 g/L hasta 0.58g/L (Figura 16). Además se observa una fase estacionaria más larga que la fase estacionaria que presenta el cultivo con mezcla (A+CO<sub>2</sub>+NO).

Estos resultados podrían interpretarse considerando que el crecimiento de *S. dimorphus* cuando se suministra (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>) es muy parecido al crecimiento que tiene lugar cuando se suministra solamente SO<sub>2</sub> (Figura 16) y es más bajo que cuando se suministra la mezcla (A+CO<sub>2</sub>+NO). Esto en parte debido a la poca solubilidad del NO y probablemente a la toxicidad que pudiera traer consigo la conversión del SO<sub>2</sub> a SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Giordano *et al.*, 2005<sub>a</sub>). Esto sugiere que la incorporación de estos gases en los cultivos de microalgas puede ayudar a disminuir el periodo de cultivo, potenciar su crecimiento (cuando no presentan toxicidad y son solubles), ya que los incorporan más rápidamente que si estuvieran en forma de sal disuelta.

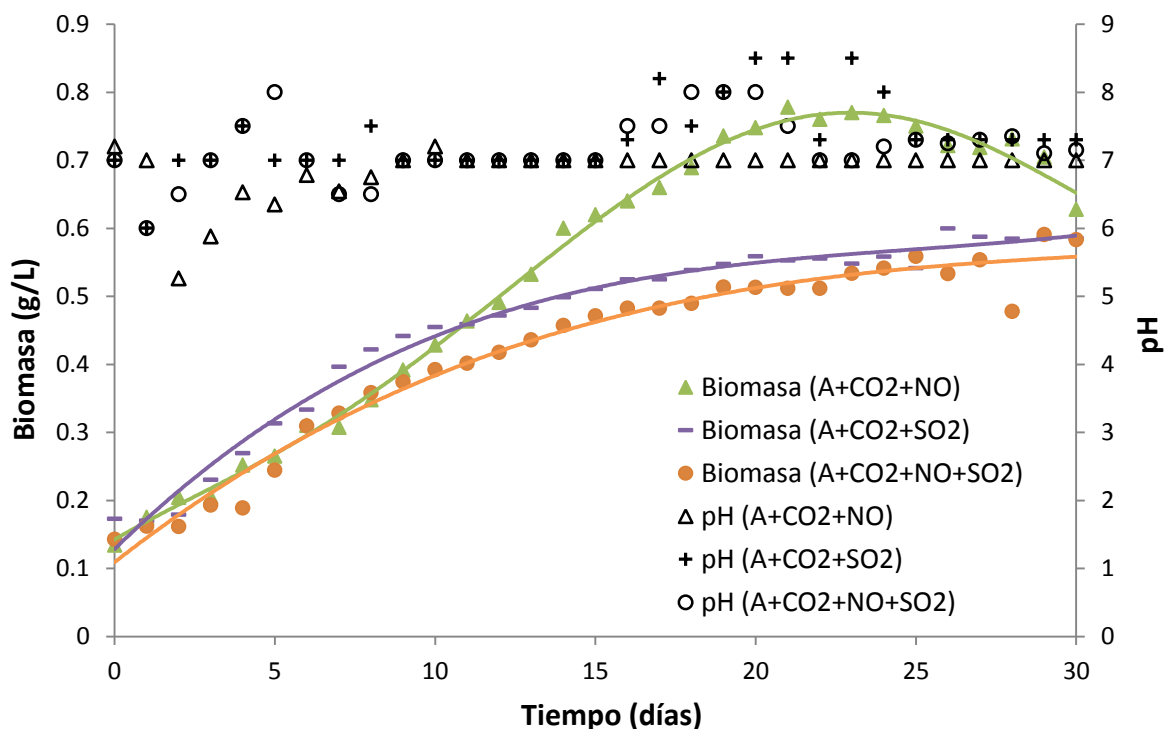


Figura 16. Crecimiento de *S. dimorphus* con suministro de las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>+NO), (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>).

#### 4.5 Eficiencia de Utilización de CO<sub>2</sub> y Velocidad de fijación de CO<sub>2</sub>

Las mayores eficiencias de utilización de CO<sub>2</sub> (Ec) y velocidad de fijación de CO<sub>2</sub> (Fc) fueron de 0.2% y 0.051 g CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para el cultivo que tuvo una alimentación de mezcla (A+CO<sub>2</sub>+NO) (Tabla 3 y Figura 17).

Por otra parte los valores más bajos de Ec y Fc fueron de 0.11% y 0.0283 g CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> (Tabla 3) correspondientes al cultivo donde se alimentó la mezcla (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>). Si tomamos como base el cultivo donde se alimentó con mezcla (A+CO<sub>2</sub>) la presencia del SO<sub>2</sub> inhibe la velocidad de crecimiento máxima ( $\mu_{\max}$ ) y la eficiencia de utilización del CO<sub>2</sub>, (Figura 17) y se podría decir que el SO<sub>2</sub> es un componente tóxico.

Jiang *et al.* (2013) reportaron una eficiencia de utilización de CO<sub>2</sub> del 0.17% y una velocidad de fijación de CO<sub>2</sub> de 0.068 g CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> cuando *S. dimorphus* fue cultivada con alimentación de una mezcla gaseosa compuesta de 15% CO<sub>2</sub>, 400 ppm SO<sub>2</sub> y 300 ppm NO.

Otra razón de la diferencia entre el trabajo de Jiang *et al.* (2013) y este estudio, puede ser debida a que el inóculo no se adaptó previamente a las condiciones que tendría en los cultivos dentro de los biorreactores. Por su parte, Yun *et al.* (1997) mostraron que la aclimatación del inóculo fue importante y encontraron que cultivos de *Chlorella vulgaris* mantenida con aire, creció menos en un medio que contenía 15% CO<sub>2</sub> (v/v) sin adaptación, pero cuando el inóculo fue adaptado previamente en presencia de aire con 5% CO<sub>2</sub>, la microalga creció mejor en el medio alimentado con gas al 15% CO<sub>2</sub>.

#### 4.6 Velocidades de crecimiento máximo ( $\mu_{\max}$ ).

El cultivo alimentado con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>) mostró la mayor velocidad de crecimiento máximo de 0.093 d<sup>-1</sup>, por el contrario el cultivo alimentado con aire (A) mostró la menor velocidad de crecimiento con un valor de 0.066 d<sup>-1</sup>. Los cultivos alimentados con las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>+NO), (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>) quedaron en valores intermedios entre estos dos últimos.

Comparando nuestros resultados con los de Raddmann *et al.* (2011) para una cepa aislada de *S. obliquus*, cultivada con alimentación de 12% CO<sub>2</sub>, 100 ppm NO y 60 ppm SO<sub>2</sub>, los autores encontraron una velocidad específica de crecimiento máxima de 0.24 h<sup>-1</sup>, una productividad de 0.04 g cel L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y una Eficiencia de utilización de CO<sub>2</sub> del 8.6%. Este estudio muestra que *S. obliquus* es capaz de crecer a mayor velocidad que *S. dimorphus* además que tiene una productividad con valor cercano a la productividad promedio de nuestros dos mejores estudios (0.026 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>).

Tabla 3. Velocidades de crecimiento máximas ( $\mu_{\max}$ ), productividades, velocidades de fijación de CO<sub>2</sub> (Fc) y eficiencias de utilización de CO<sub>2</sub> (Ec), por *S. dimorphus* alimentada con las diferentes mezclas de gases

Mezcla de gases	$\mu_{\max}$ (d <sup>-1</sup> )	Productividad (g cel L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Fc (g CO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Ec (%)
0.038% CO <sub>2</sub> (A)	0.066	0.019	0.035	0.1
12% CO <sub>2</sub> (A+CO <sub>2</sub> )	0.093	0.024	0.045	0.18
12% CO <sub>2</sub> – 100 ppm NO (A+CO <sub>2</sub> +NO)	0.082	0.028	0.051	0.20
12% CO <sub>2</sub> – 60 ppm SO <sub>2</sub> (A+CO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub> )	0.079	0.0157	0.0288	0.11
12% CO <sub>2</sub> – 100 ppm NO – 60 ppm SO <sub>2</sub> (A+CO <sub>2</sub> +NO+SO <sub>2</sub> )	0.074	0.0154	0.0283	0.11

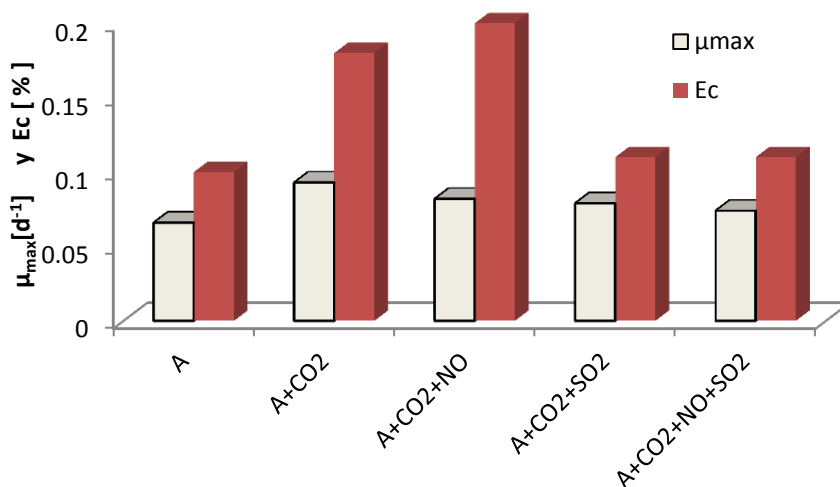


Figura 17. Velocidades de crecimiento máximas ( $\mu_{\max}$ ), y eficiencias de utilización de CO<sub>2</sub> (Ec) para todos los cultivos.



#### 4.7 Efecto de los gases CO<sub>2</sub>, NO y SO<sub>2</sub> en el pH del medio de cultivo

Durante el crecimiento de *S. dimorphus* en los diferentes cultivos alimentados con las mezclas de gases (A), (A+CO<sub>2</sub>), (A+CO<sub>2</sub>+NO), (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>), se llevaron a cabo mediciones de pH, en el periodo en donde se suministraban los gases.

En estos experimentos se observó que cuando se suministró la mezcla (A+CO<sub>2</sub>), el pH tiende a bajar hasta 6.4 en los primeros 5 días de cultivo, a partir de ahí, el pH estuvo variando en un intervalo de 6.4 a 7.2 durante los 30 días de cultivo. Esto debido a la formación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> por la continua adición de CO<sub>2</sub>. En contraste, cuando se suministró solamente aire el pH del medio de cultivo se encontraba en un intervalo de 7 a 8, esto debido a la oxidación que los compuestos presentes en el medio por acción del oxígeno del aire (Figura 18).

En la literatura se mencionan por lo menos 14 reacciones en el equilibrio químico que suceden en la fase líquida o el medio de cultivo de las microalgas (Tabla 4).

Tabla 4. Reacciones más relevantes y su pK en el equilibrio químico que se pueden tener en los biorreactores. (Adaptada de Concas *et al.*, 2012)

Reacción en el equilibrio químico	pK	Referencias	Ecuación No.
$CO_{2l} + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3$	2.77	Welch <i>et al.</i> , 1969	40
$CO_{2l} + OH^- \leftrightarrow HCO_3^-$	6.32	Johnson, 1982	41
$H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$	6.35	Perrin, 1972	42
$HCO_3^- \leftrightarrow H^+ + CO_3^{2-}$	10.33	Perrin, 1972	43
$H_3PO_4 \leftrightarrow H^+ + H_2PO_4^-$	2.16	Perrin, 1972	44
$H_2PO_4^- \leftrightarrow H^+ + HPO_4^{2-}$	7.2	Perrin, 1972	45
$HPO_4^{2-} \leftrightarrow H^+ + PO_4^{3-}$	12.32	Perrin, 1972	46
$H_2SO_4 \leftrightarrow H^+ + HSO_4^-$	-3.10	Perrin, 1972	47
$HSO_4^- \leftrightarrow H^+ + SO_4^{2-}$	2.04	Perrin, 1972	48
$Mg^{2+} + H_2O \leftrightarrow MgOH^+ + H^+$	12.0	Perrin, 1972	49
$MgOH^+ + H_2O \leftrightarrow Mg(OH)_{2,L} + H^+$	16.5	Rijck y Schrevens, 1997	50
$Ca^{2+} + H_2O \leftrightarrow CaOH^+ + H^+$	13.04	Perrin, 1972	51
$CaOH^+ + H_2O \leftrightarrow Ca(OH)_{2,L} + H^+$	15.3	Rijck y Schrevens, 1997	52
$H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^-$	14.0	Perrin, 1972	53

También se observó que en el suministro de la mezcla (A+CO<sub>2</sub>+NO), el pH bajó a 6 en el primer día de cultivo, debido a que la disolución del NO en medio acuoso forma HNO<sub>2</sub>, lo que le proporciona aún mayor acidez.

Con el fin de contrarrestar el efecto del pH ácido en el medio de cultivo, se adicionó una solución de NaOH al 5%. El pH del medio de cultivo donde se usó la mezcla de (A+CO<sub>2</sub>+NO) se mantuvo en un intervalo de 6.8 a 8 (Figura 18).

Finalmente, en los cultivos con suministro de las mezclas (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>), también se observó una caída del pH hasta un valor de 6, esto en el primer día de cultivo debido a que la disolución de NO en agua forma HNO<sub>2</sub>, y la disolución del SO<sub>2</sub> forma HSO<sub>3</sub>. Estos dos ácidos contribuyeron a aumentar la acidez del medio de cultivo.

En toda la operación de los cultivos (30 días) no se observaron cambios drásticos de pH, el cual no bajó más allá de 6 y se mantuvo entre 7 a 8.8 (Figuras 18 y 19). Esto probablemente debido a las especies químicas disueltas de nitrógeno, NO<sub>2</sub>, y HNO<sub>2</sub>, ya que oxidan el SO<sub>2</sub> acuoso. El nitrito disuelto puede reaccionar fotoquímicamente para producir radicales OH<sup>•</sup> y éstos a su vez pueden reaccionar oxidando el sulfito disuelto (Manahan, 2007).

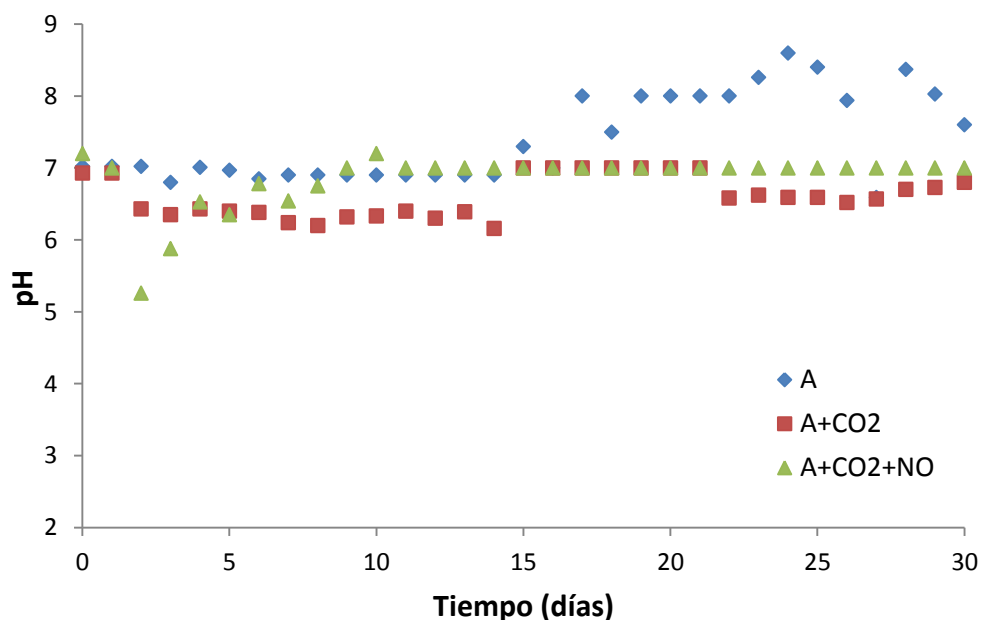


Figura 18. Variación del pH en los cultivos suministrados con aire (A) y las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO)

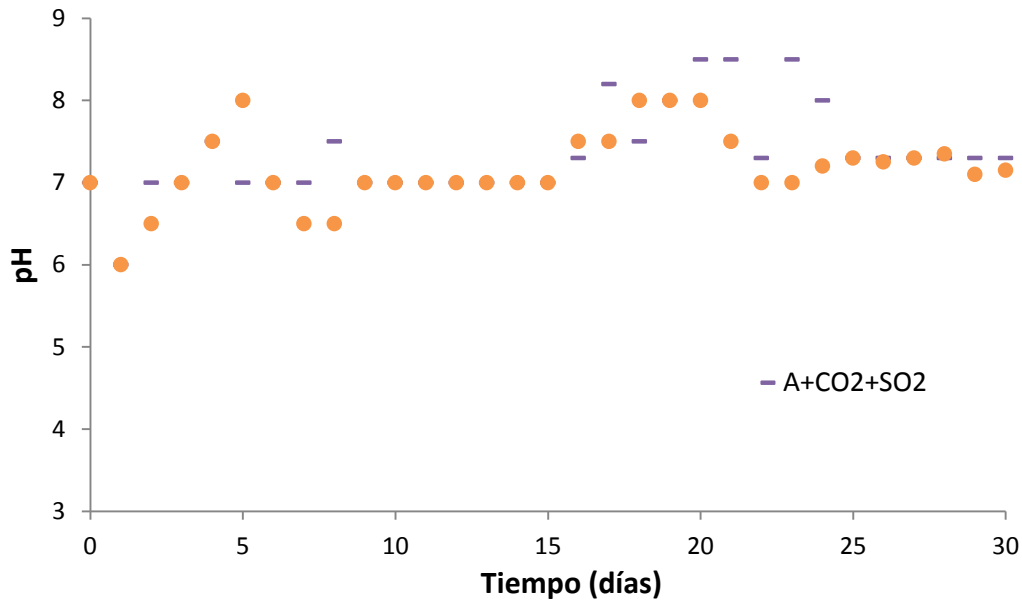


Figura 19. Variación del pH en los cultivos suministrados con las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>)

#### 4.8 Análisis del CO<sub>2</sub> residual expresado como HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>3</sub><sup>=</sup>.

Las concentraciones de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> que fueron evaluadas por titulación con HCl en la fase líquida (Figura 20) son una medida del CO<sub>2</sub> residual dentro del medio de cultivo.

El cultivo donde se alimentó solo aire (A) mostró una clara disminución del ion HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en función del tiempo a diferencia de los otros dos cultivos donde se alimentó CO<sub>2</sub> y (CO<sub>2</sub>+NO) donde no se observa una clara tendencia del ion HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en función del tiempo debido a que existió una continua transferencia de CO<sub>2</sub> entre lo absorbido por el organismo y lo absorbido por la fase líquida, es decir que en estos dos cultivos siempre estuvo presente el suministro de CO<sub>2</sub> a diferencia del cultivo donde sólo se alimentó aire.

En estos experimentos el cultivo que más biomasa produjo y que fue alimentado con el gas (A+CO<sub>2</sub>+NO) tuvo una concentración promedio de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 0.22 g/L, mientras que el cultivo que fue alimentado con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>) mostró una concentración mayor de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0.35 g/L). Estos resultados se explican porque el cultivo donde se adicionó la mezcla gaseosa (A+CO<sub>2</sub>+NO), tuvo lugar una mayor absorción del CO<sub>2</sub> desde la fase líquida hasta la microalga (0.77 g de biomasa/L) mientras que en el cultivo alimentado con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>) *S. dimorphus* no asimiló tanto CO<sub>2</sub> de la fase líquida, por lo tanto mostró un menor incremento en la biomasa (0.68 g/L).

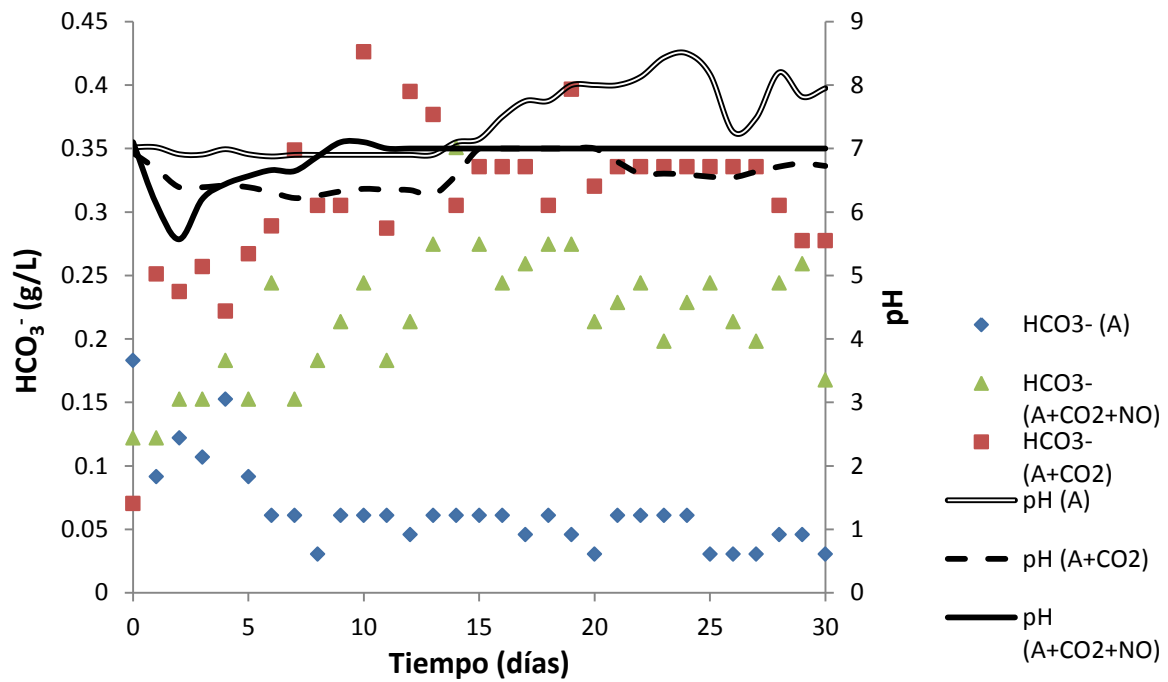


Figura 20. Carbón inorgánico disuelto en los cultivos suministrados con aire (A), y las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO)

En el caso de la variación del ion bicarbonato para los cultivos (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>) que se muestran en la Figura 21 se observó un incremento de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  y la presencia de iones  $\text{CO}_3^{=}$  en función del tiempo a diferencia de los cultivos donde no se adicionó SO<sub>2</sub> (Figura 20). En aquellos cultivos solo se detectó la presencia del ion  $\text{HCO}_3^-$  mientras que en los cultivos donde se adicionó SO<sub>2</sub> aparece también el ion  $\text{CO}_3^{=}$ .

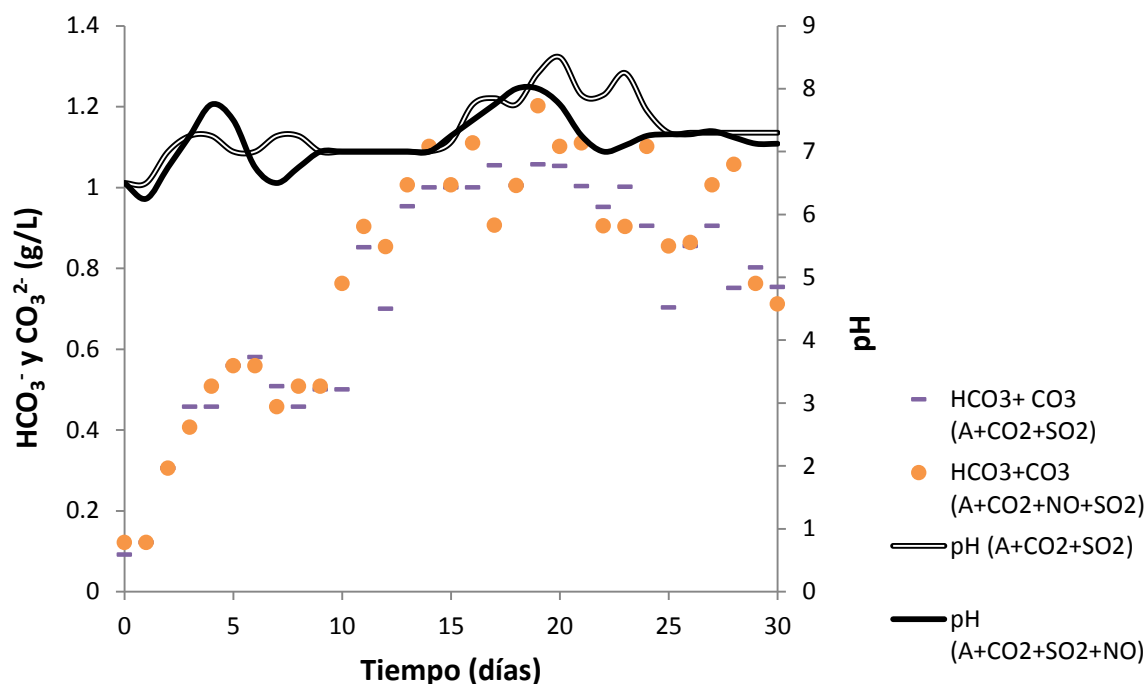


Figura 21. Carbón inorgánico disuelto en los cultivos suministrados con las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>)

Las curvas de los dos cultivos conteniendo SO<sub>2</sub> muestran la misma tendencia que el cultivo de (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>+ CO<sub>3</sub><sup>=</sup>) durante todo el intervalo de evaluación (Figura 21) y no se encontró ninguna diferencia, el valor máximo fue de (1.2 g de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>+CO<sub>3</sub><sup>=</sup>/L) pero al comparar estas curvas de concentración con las correspondientes curvas de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de los cultivos alimentados con las mezclas (A+CO<sub>2</sub>+NO) y (A+CO<sub>2</sub>), se observa que las concentraciones de ion HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de estos últimos son mucho menores (0.35 g/L), lo cual está relacionado con la formación de biomasa. Es decir que en los cultivos donde está presente el SO<sub>2</sub>, la biomasa es menor (0.58 g/L, Figura 16) pero la cantidad de CO<sub>2</sub> disuelto en agua (representado por el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>+ CO<sub>3</sub><sup>=</sup>) es mayor (1.2 g/L, Figura 21).

#### 4.9 Análisis de Nitritos y Nitratos

La evidencia del consumo de nitrógeno por parte de la microalga en función del tiempo de cultivo se muestra en la Figura 22, es decir la fuente de nitrógeno expresado como concentración de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) muestra que en un período de tiempo cercano a 30 días el cultivo alimentado con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>) disminuyó a 0.022 g/L e inició en 0.05 g/L.

Por su parte el cultivo alimentado con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) disminuyó 0.015 g/L y de igual manera este cultivo inicio con una concentración similar al primer cultivo (0.05g/L). Es decir este último cultivo conteniendo SO<sub>2</sub>, removió más nitrógeno del medio líquido. No sabemos si parte del nitrógeno reaccionó con el SO<sub>2</sub> en fase líquida formado otros compuestos que no son detectados por el reactivo de Griess.

En el caso de los otros cultivos en donde se inyectaron las corrientes gaseosas restantes, (Figura 23) se observan pequeñas variaciones de nitrógeno en el transcurso de 30 días. La disminución en el caso del cultivo alimentado con la mezcla (A+CO<sub>2</sub>+NO) fue de 0.009 g de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L mientras que en el cultivo alimentado con (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>) la variación fue de 0.008 g de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/L.

En un estudio del efecto que tiene la presencia de altas y bajas concentraciones de nitrógeno sobre el crecimiento de *Scenedesmus obliquus* (Guido *et al.*, 2015) se menciona que medios de cultivo donde no se suministra una concentración óptima de nitrógeno (inorgánico) la composición del organismo se inclina a tener ácidos grasos, existiendo también la formación de almidones con una relación de 1 de ácidos grasos por 4 partes de almidón.

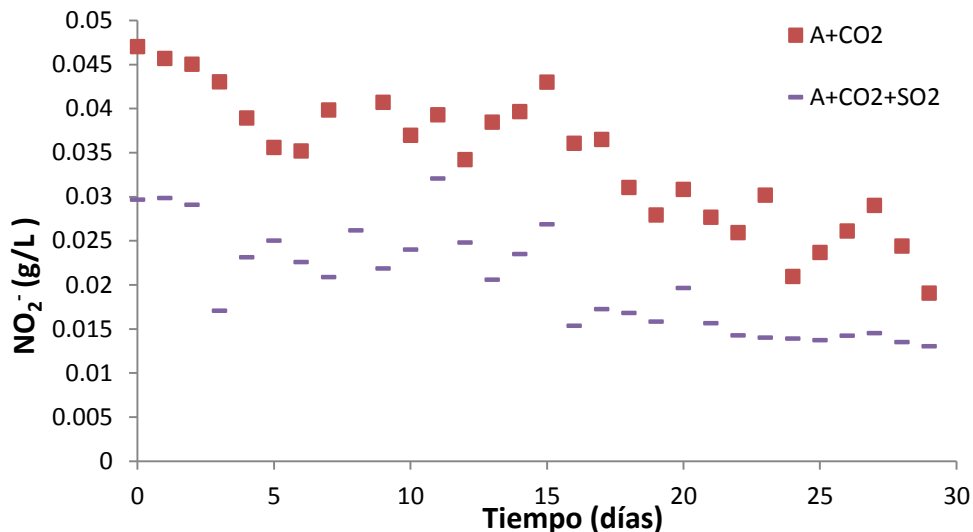


Figura 22. Nitratos disueltos en los cultivos con suministro de las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>), (A+CO<sub>2</sub>+SO<sub>2</sub>) la fuente de nitrógeno que se adicionó en el medio de cultivo fue NaNO<sub>3</sub>.

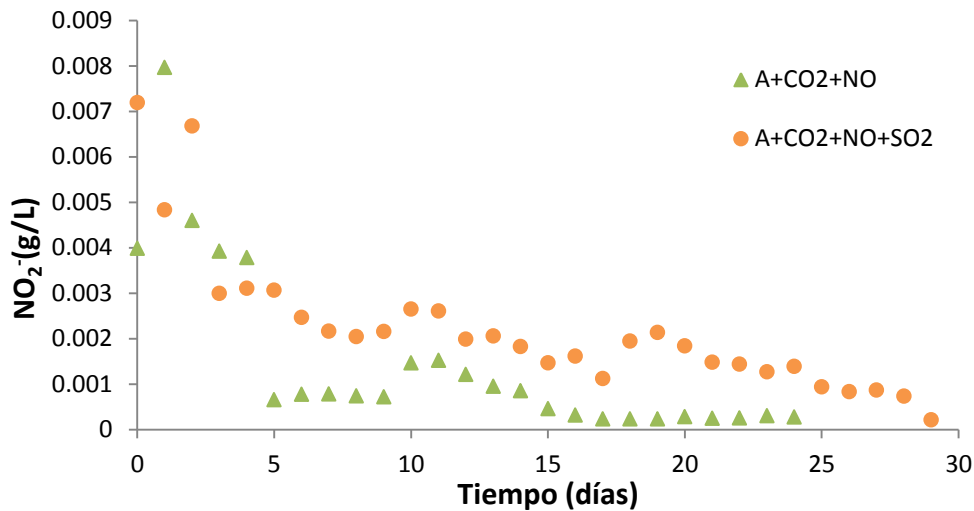


Figura 23. Nitritos disueltos en los cultivos con suministro de las mezclas gaseosas (A+CO<sub>2</sub>+NO) y (A+CO<sub>2</sub>+NO+SO<sub>2</sub>)

#### 4.10 Análisis de Sulfatos

La concentración de SO<sub>2</sub> absorbido en el medio de cultivo y transformado a SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, se puede observar en la Figura 24. Aquí se observan como el medio de cultivo se va saturando de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> debido a la oxidación del SO<sub>2</sub> por la gran cantidad de oxígeno, NO y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> presentes en el medio de cultivo. Esto sugiere que en el proceso de oxidación de SO<sub>2</sub> a SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> pudieran formarse especies químicas tóxicas (Giordano *et al.*, 2005<sub>a</sub>) para *S. dimorphus*, lo cual se ve reflejado en la disminución de su crecimiento.

También se observó que el SO<sub>2</sub> en el medio de cultivo se encontraba en concentraciones de hasta 0.5 g/L, esto debido a la alta solubilidad del SO<sub>2</sub> en agua (222 g/L) y ya que se alimentó en una concentración de 60 mg/L es probable que todo este SO<sub>2</sub> se haya disuelto en el medio de cultivo encontrándose éste en concentraciones excesivas, ya que la concentración de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en un medio de cultivo convencional es de 0.075 g/l.

Jiang *et al.* (2013) mencionaron que esta microalga tolera concentraciones de hasta 100 mg/l de SO<sub>2</sub> en los gases de chimenea pero fue necesario neutralizar el medio de cultivo con sales básicas como el CaCO<sub>3</sub> utilizando un sistema de inyección no continua (sparging) mantuvieron su cultivo a pH de 7, obteniendo crecimientos de hasta 3.2 g/l de microalga.

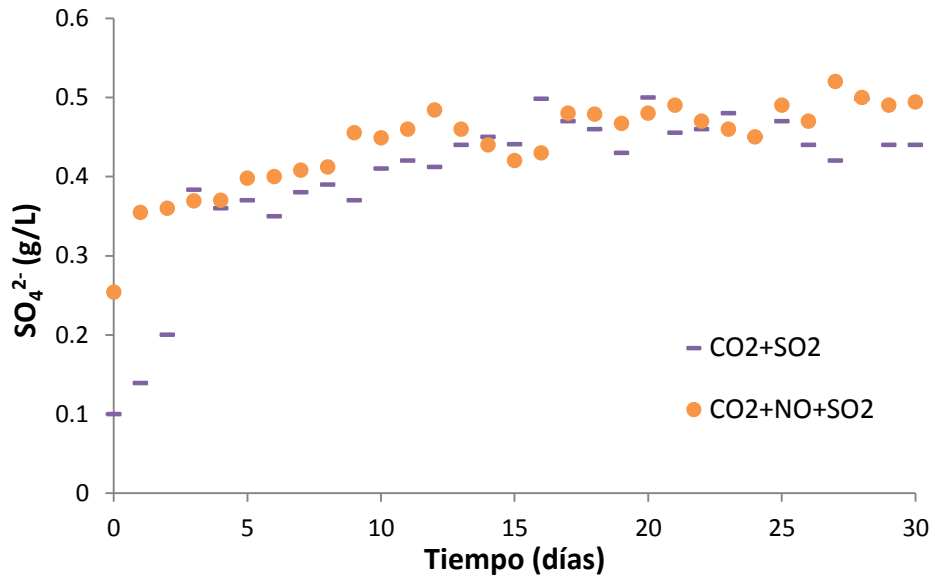


Figura 24. Variación del  $\text{SO}_2$  absorbido en los cultivos con suministro de las mezclas gaseosas ( $\text{A}+\text{CO}_2+\text{SO}_2$ ) y ( $\text{A}+\text{CO}_2+\text{NO}+\text{SO}_2$ )

#### 4.11 Análisis $\text{CO}_2$ y $\text{O}_2$ a la salida de los biorreactores

Los análisis de  $\text{CO}_2$  en la fase gaseosa para el cultivo que se alimentó con aire (A) y la mezcla ( $\text{A}+\text{CO}_2$ ) muestra que conforme aumenta el tiempo, la cantidad de  $\text{CO}_2$  en fase gaseosa a la salida de los biorreactores, aumenta debido a que el medio de cultivo se va saturando de biomasa y de  $\text{CO}_2$  disuelto (Figura 25).

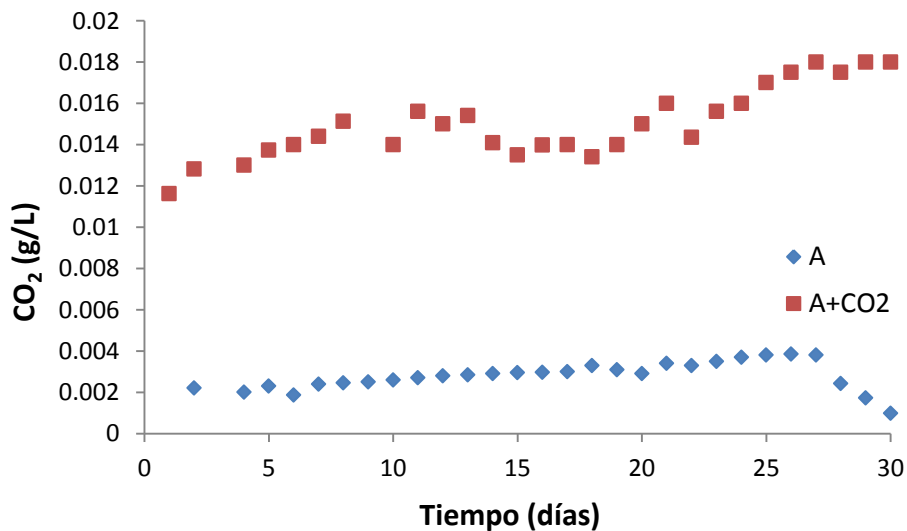


Figura 25.  $\text{CO}_2$  en la fase gaseosa a la salida de los reactores con alimentación de aire (A) y la mezcla ( $\text{A}+\text{CO}_2$ )



Por otra parte, la concentración de O<sub>2</sub> a la salida de los reactores alimentados con aire (A) y la mezcla (A+CO<sub>2</sub>), (Figura 26) va aumentando conforme pasa el tiempo de cultivo. Cabe mencionar que estos resultados representan la concentración de O<sub>2</sub> contenido en las mezclas y el O<sub>2</sub> producido por *S. dimorphus*.

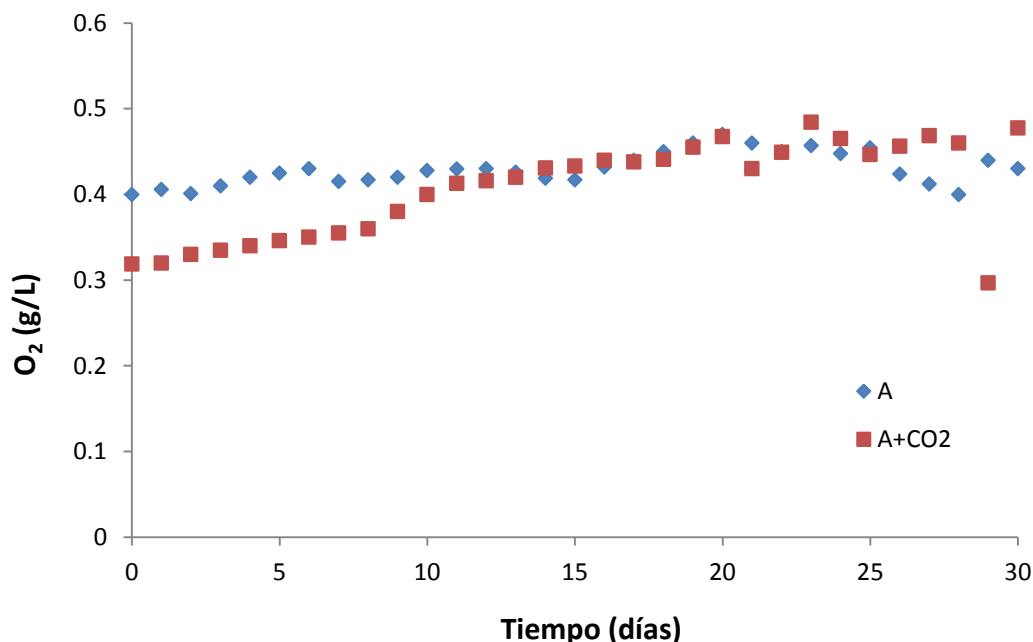


Figura 26. Oxígeno en la fase gaseosa a la salida de los reactores con alimentación de aire (A) y la mezcla gaseosa (A+CO<sub>2</sub>)

#### 4.12 Análisis Cinético de crecimiento.

Las curvas de crecimiento de biomasa en función del tiempo sugieren una cinética del tipo Monod:

$$r_g = \mu C_c \quad (54)$$

Donde: 
$$\mu = \mu_M \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (55)$$

- Donde:
- $r_g$  = velocidad de crecimiento celular [g/L]
  - $C_c$  = concentración de células o de biomasa [g/L]
  - $\mu$  = velocidad de crecimiento específica [d<sup>-1</sup>]
  - $C_s$  = concentración de sustrato [g/L]
  - $\mu_M$  = velocidad de crecimiento específica máxima [d<sup>-1</sup>]
  - $K_s$  = constante de la ecuación de Monod [g/L]

Los valores calculados de la ecuación de Monod para el cultivo donde solo se alimentó aire (A) (Figura 21) mostraron un valor de  $K_s = 0.03 \text{ g/L}$ , el valor de  $\mu_M = 0.066\text{h}^{-1}$ . Para estos cálculos se requirió del ajuste exponencial de los datos experimentales (polinomio de orden 3) y a partir de estos polinomios se calculó la derivada, la cual corresponde con la velocidad de crecimiento celular ( $dC_c/dt$ ) o también  $r_g$ .

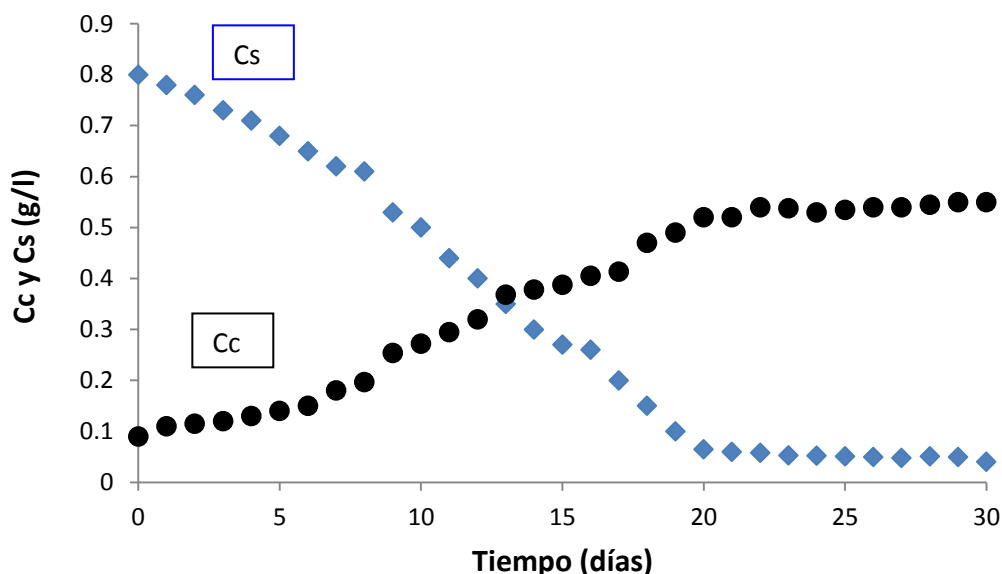


Figura 27. Concentración de biomasa y de sustrato del cultivo alimentado con aire (A) en el que se aplicó la ecuación de Monod.

Tabla 5. Ecuaciones de los polinomios de ajuste de datos experimentales para calcular la derivada y con ello calcular la velocidad de crecimiento celular para los cultivos alimentados con las diferentes mezclas de gases.

Mezclas Gaseosas Alimentadas	Polinomio	Ecuación No.
(A)	$C_c = -0.00004t^3 + 0.0016t^2 + 0.0062t + 0.0879$	56
(A+CO <sub>2</sub> )	$C_c = 0.00004C_c^5 - 0.00003t^4 + 0.0009t^3 - 0.0074t^2 + 0.0225t$	57
(A+CO <sub>2</sub> +NO)	$C_c = -0.00007t^3 + 0.0021t^2 + 0.0118t + 0.1582$	58
(A+CO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub> )	$C_c = 0.00003t^3 - 0.002t^2 + 0.0488t + 0.1238$	59
(A+CO <sub>2</sub> +NO+SO <sub>2</sub> )	$C_c = 0.00001t^3 - 0.001t^2 + 0.0369t + 0.192$	60

Tabla 6. Derivadas de los polinomios de ajuste de datos experimentales (o  $r_g$ ) para los cultivos alimentados con las diferentes mezclas de gases.

Mezclas Gaseosas Alimentadas	Derivada del polinomio	No.
(A)	$\frac{dCc}{dt} = -0.00012t^2 + 0.0032t + 0.0062$	61
(A+CO <sub>2</sub> )	$\frac{dCc}{dt} = -0.00021t^2 + 0.0072t - 0.0246$	62
(A+CO <sub>2</sub> +NO)	$\frac{dCc}{dt} = -0.00021t^2 + 0.0042t + 0.0118$	63
(A+CO <sub>2</sub> +SO <sub>2</sub> )	$\frac{dCc}{dt} = 0.00009t^2 - 0.004t + 0.0488$	64
(A+CO <sub>2</sub> +NO+SO <sub>2</sub> )	$\frac{dCc}{dt} = 0.00003t^2 - 0.002t + 0.0369$	65

Estos valores de las derivadas sirven para calcular las constantes de la ecuación de Monod.

### 4.13 Balance de CO<sub>2</sub>

En esta sección se agrega el balance de masa para comprobar el metabolismo del CO<sub>2</sub> por la microalga *Scenedesmus dimorphus*.

El balance de masa se realizó para el CO<sub>2</sub> en la fase líquida y en la fase gaseosa, y se basó en el modelo previamente utilizado por Concas et al. (2007) (Ecuación 66).

#### 4.13.1 Balance de CO<sub>2</sub> en la fase líquida

(Acumulación de CO<sub>2</sub> en la fase líquida) = (CO<sub>2</sub> proveniente de la transferencia gas-líquido) – (CO<sub>2</sub> consumido por la microalga)

$$V_l * \frac{dCO_2}{dt} = V_l K_{lCO_2} a_v (HE_{CO_2} * [CO_{2g}] - [CO_{2l}]) - Y_c \mu V_l C \quad (66)$$

Donde

$dCO_2/dt$  = velocidad de acumulación de  $CO_2$  en la fase líquida ( $g CO_2 d^{-1}$ )

$V_1$  = volumen del líquido (L)

$Kl_{CO_2}$  = Coeficiente de transferencia de masa gas – líquido ( $m s^{-1}$ )

$a_v$  = Área interfacial gas – líquido ( $m^{-1}$ )

$He$  = Constante de Henry para el equilibrio gas – líquido (adimensional)

$[CO_{2g}]$  = Concentración de  $CO_2$  en la fase gaseosa ( $g L^{-1}$ )

$[CO_{2l}]$  = Concentración de  $CO_2$  en la fase líquida ( $g L^{-1}$ )

$Y_{c/s}$  = Rendimiento máximo de carbono en biomasa (%)

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento ( $d^{-1}$ )

$C$  = Biomasa ( $g L^{-1}$ )

Para el cálculo del Coeficiente de transferencia de masa gas – líquido ( $Kl_{CO_2}$ ) se utilizó la ecuación de Calderbank (Smith, 1991).

$$Kl_{CO_2} = 0.31 \left( \frac{\Delta\rho \mu_l g_1}{\rho_l^2} \right)^{1/3} \left( \frac{\rho_l D_{CO_2}}{\mu_l} \right)^{2/3} \quad (67)$$

Donde

$\Delta\rho$  = densidad del líquido – densidad del  $CO_2$  ( $g cm^{-3}$ )

$\mu_l$  = viscosidad del líquido ( $g cm^{-1} s^{-1}$ )

$g_1$  = constante de aceleración de la gravedad ( $cm s^{-2}$ )

$D_{CO_2}$  = difusividad del  $CO_2$  en agua ( $cm^2 s^{-1}$ )

El cálculo del área interfacial ( $a_v$ ) (Smith, 1991), está dado por:

$$\frac{a_v}{V_{B1}} = \frac{\pi db^2}{(\pi db^3)/6}; \quad V_{B2} = \frac{Q_g L}{v_B V_l}; \quad V_{B1} = V_{B2} \quad (68 \text{ y } 69)$$

Donde

$V_{B1}$  = volumen de burbuja ( $\text{cm}^3$ )

$d_b$  = diámetro de burbuja (cm)

$V_{B2}$  = retención del gas (adimensional)

$Q_g$  = flujo volumétrico de la mezcla gaseosa ( $\text{L min}^{-1}$ )

$L$  = longitud del líquido (cm)

$V_1$  = volumen del líquido (L)

Para el cálculo de la concentración de  $\text{CO}_2$  alimentado, se utilizó la ecuación de la ley general de los gases ideales

$$P_{\text{CO}_2}V = nRT \quad (70)$$

Despejando

$$\text{Concentración de } \text{CO}_2 = \frac{n/PM}{V} = \frac{P_{\text{CO}_2}}{RT} \quad (71)$$

Donde

$P_{\text{CO}_2}$  = presión parcial del  $\text{CO}_2$  en la mezcla gaseosa (atm)

$V$  = volumen del gas (L)

$n$  = número de moles

$R$  = constante de los gases ideales ( $\text{L atm mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )

$T$  = temperatura del gas (K)

$PM$  = peso molecular del  $\text{CO}_2$  ( $\text{g mol}^{-1}$ )

#### 4.13.2 Balance de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa

Acumulación de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa = CO<sub>2</sub> alimentado – CO<sub>2</sub> a la salida del reactor – CO<sub>2</sub> proveniente de la transferencia gas-líquido

(72)

$$Vg \frac{dCO_2}{dt} = Qg^{alimentado} [CO_2^{alimentado}] - Qg^{salida} [CO_2^{salida}] - V_l K_{lCO_2} a_v (H_{ECO_2} [CO_{2g}] - [CO_{2l}])$$

Donde

V<sub>g</sub> = volumen del reactor correspondiente a la fase gaseosa (L)

Q<sub>g</sub> alimentado = flujo volumétrico del gas alimentado (L min<sup>-1</sup>)

[CO<sub>2</sub>alimentado] = Concentración de CO<sub>2</sub> alimentado (g L<sup>-1</sup>)

Q<sub>g</sub> salida = flujo volumétrico de CO<sub>2</sub> a la salida del reactor (L min<sup>-1</sup>)

[CO<sub>2</sub> salida] = Concentración de CO<sub>2</sub> a la salida del reactor (g L<sup>-1</sup>)

Tabla 7. Variables utilizadas en el cálculo del balance de CO<sub>2</sub> en la fase líquida y en la fase gaseosa

Variable usada	Valor	Unidades	Referencia
V <sub>1</sub>	2.844	L	medido
Y <sub>c/s</sub>	0.5	adimensional	Jiang <i>et al.</i> , 2013
K <sub>lCO<sub>2</sub></sub>	0.078	m s <sup>-1</sup>	Calculado
a <sub>v</sub>	52.224	m <sup>-1</sup>	Calculado
He	0.832	adimensional	Zeebe, 2011
[CO <sub>2</sub> g]	1.673	g L <sup>-1</sup>	Calculado
P <sub>CO<sub>2</sub></sub>	0.96	Kg cm <sup>-2</sup>	Calculado
T	298	K	Medido
R	0.082	L atm mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	Perry y Chilton, 1973
PM	44	g mol <sup>-1</sup>	Perry y Chilton, 1973
Q <sub>g</sub>	0.495	L min <sup>-1</sup>	Medido
d <sub>b</sub>	0.001	m	Smith, 1991
g <sub>1</sub>	980	cm s <sup>-2</sup>	Smith, 1991

$D_{CO_2}$	0.041	$cm^2 s^{-1}$	Welty <i>et al.</i> , 1994
$\rho_l$	1	$g cm^{-3}$	Perry y Chilton, 1973
$\rho_{CO_2}$	0.00702	$g cm^{-3}$	calculado
$\mu_l$	0.00578	$lb ft^{-1} s^{-1}$	Welty <i>et al.</i> , 1994

#### 4.13.3 Resultados del balance de CO<sub>2</sub> en la fase líquida

La variación de la concentración de CO<sub>2</sub> en función del tiempo en la fase líquida disminuye conforme pasa el tiempo desde 520 g/d hasta 23.3 g/d (Tabla 8) mientras que la cantidad de CO<sub>2</sub> transferida desde la fase gas a la fase líquida tiene un comportamiento muy parecido. Por su parte la cantidad de CO<sub>2</sub> acumulada por día en la biomasa tiene valores pequeños.

Tabla 8. Resultados de la acumulación de CO<sub>2</sub> en el medio líquido

Tiempo (días)	CO <sub>2</sub> en la biomasa (g/d)	CO <sub>2</sub> por transferencia gas-liq (g d <sup>-1</sup> )	V <sub>1</sub> (dCO <sub>2</sub> /dt) (g d <sup>-1</sup> )
0	0.0034	520.72	520.72
1	0.0025	503.57	503.57
2	0.0042	486.42	486.41
3	0.0034	469.27	469.26
4	0.0067	452.11	452.11
5	0.0075	434.96	434.96
6	-0.0043	417.81	417.82
7	0.0163	400.66	400.64
8	0.0132	383.51	383.50
9	0.0203	366.36	366.34
10	0.0211	349.21	349.18
11	0.0439	332.05	332.01
12	0.0368	314.90	314.87
13	0.0644	297.75	297.69
14	0.0504	280.60	280.55
15	0.0896	263.45	263.36
16	0.0313	246.30	246.26
17	0.0742	229.14	229.07
18	0.0355	211.99	211.96
19	0.0217	194.84	194.82
20	0.0695	177.69	177.62
21	0.0573	160.54	160.48

22	0.0137	143.39	143.40
23	0.0778	126.24	126.16
24	0.0094	109.08	109.09
25	0.0257	91.93	91.96
26	0.1101	74.78	74.67
27	0.0068	57.63	57.64
28	0.0276	40.48	40.45
29	0.0110	23.33	23.32

#### 4.13.4 Resultados del balance de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa

La variación de la concentración de CO<sub>2</sub> en función del tiempo en la fase gas aumenta conforme pasa el tiempo desde 71.39 g/d hasta 566.41 g/d (Tabla 9) mientras que la cantidad de CO<sub>2</sub> transferida desde la fase gas a la fase líquida disminuye debido al consumo que se experimenta conforme aumenta la masa celular. Por su parte la diferencia entre la cantidad de CO<sub>2</sub> que entra menos la que sale del reactor prácticamente permanece constante.

Tabla 9. Resultados de la acumulación de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa

Tiempo (días)	(CO <sub>2</sub> alimentado) – (CO <sub>2</sub> a la salida del reactor) (g d <sup>-1</sup> )	CO <sub>2</sub> por transferencia gas-liq (g d <sup>-1</sup> )	Vg (dCO <sub>2</sub> /dt) (g d <sup>-1</sup> )
0	592.12	520.72	71.39
1	591.69	503.57	88.12
2	591.62	486.42	105.21
3	591.36	469.27	122.10
4	591.27	452.11	139.15
5	591.13	434.96	156.16
6	590.87	417.81	173.05
7	591.27	400.66	190.61
8	590.69	383.51	207.19
9	590.91	366.36	224.55
10	590.77	349.21	241.56
11	591.24	332.05	259.18
12	591.45	314.90	276.54
13	591.27	297.75	293.52
14	591.27	280.60	310.67
15	591.48	263.45	328.03
16	591.27	246.30	344.97



17	590.91	229.14	361.77
18	590.55	211.99	378.56
19	591.14	194.84	396.30
20	590.69	177.69	413.00
21	590.55	160.54	430.02
22	590.20	143.39	446.81
23	590.02	126.24	463.78
24	589.84	109.08	480.76
25	590.02	91.93	498.09
26	589.84	74.78	515.06
27	589.84	57.63	532.21
28	589.77	40.48	549.29
29	589.74	23.33	566.41

## 5 CONCLUSIONES

La adición de CO<sub>2</sub> en forma gaseosa a los cultivos de la microalga *Scenedesmus dimorphus* contribuyó a incrementar la concentración de biomasa respecto del cultivo en donde no se adicionó CO<sub>2</sub>.

La microalga *S. dimorphus* fue capaz de utilizar el NO que se alimentó en forma gaseosa como fuente de nitrógeno para la formación de biomasa.

La adición de NO a la mezcla gaseosa de aire y CO<sub>2</sub> que se alimentó al cultivo redujo el periodo de adaptación y el tiempo de cultivo en que se alcanzó la máxima concentración de biomasa.

Con la adición de NO el crecimiento de *S. dimorphus* se dio inmediatamente, mientras que cuando sólo se adicionó la mezcla aire y CO<sub>2</sub> el crecimiento de la concentración celular se presentó a los 8 días de iniciado el cultivo.

La microalga asimiló mejor el óxido nítrico (NO) que los nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) como fuente de nitrógeno, debido a que el cultivo en que se utilizó aire y CO<sub>2</sub> solo contenía nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en la fase líquida y no mostró el crecimiento mayor que se observó en el cultivo donde se adicionó el NO gaseoso.

En todos los cultivos, la adición 60 ppm de SO<sub>2</sub> en la fase gaseosa inhibió el crecimiento de *S. dimorphus* y con esto también la eficiencia de utilización del CO<sub>2</sub>.

El cultivo que se alimentó con la mezcla de 12% CO<sub>2</sub> más 100 ppm NO mostro la mayor eficiencia de utilización de CO<sub>2</sub> y la mayor velocidad de fijación de CO<sub>2</sub>.

El cultivo que fue alimentado con la mezcla de Aire más 12% CO<sub>2</sub> mostró la mayor velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\max}$ ).

Los resultados de crecimiento celular en función del tiempo y de las concentraciones de biomasa y de sustrato, se ajustan al modelo de Monod. Sin embargo dicho modelo obtenido en su forma matemática más simple parece estar afectado por otro término de inhibición de crecimiento de biomasa que falta por estudiar.

## 6. REFERENCIAS

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. (1992). *Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales*. pp: 2-33 – 2-43.
- Anjos M., Fernandez B.D.; Vicente A.A., Teixeira J.A. y Dragone G. (2013). Optimization of CO<sub>2</sub> bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresourse Technology*. **139**: 149-154.
- Badger M.R. y Price G.D. (2003). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* **54**: 22 – 609.
- Berberoglou, H., Gómez, P.S. y Pilon, L. (2009). Radiation characteristics of *Botryococcus braunii*, *Chlorococcum litorale*, and *Chlorella sp.* used for CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production. *J. Quant Spectrosc.* **110**: 1879-1893.
- Blaker L.A., Urban N.R., Brezonik P.L. y Sherman L.A. (1989). Sulfur cycling in a seepage lake. In: Saltzman E. Cooper W. editors. *Biogenic sulfur in the environment*. Washington D.C.: *American Chemical Society*. 79-100 p.
- Breuer G., Martens D.E., Draaisma R.B., Wijffels R.H. y Lamers P.P., (2015). Photosynthetic efficiency and carbon partitioning in nitrogen-starved *Scenedesmus obliquus*. *Algal Research*. **9**: 254 – 262.
- Brown, L.M. (1996). Uptake of carbon dioxide from gas by microalgae. *Energy Convers Manage.* **37**:7-1363.
- Chang, E.H. y Yang, S.S. (2003). Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. *Bot Bull Acad.* **44**: 43-52.
- Chisti Y. (1989). “*Airlift Bioreactors*” Pion Press, London.
- Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Advances.* **25**: 294 – 306.

- Chisti Y. (2013). Large – scale production of microalgal biomass. International Training Course. The use of microalgae for the removal of pollutants and for the production of biofuels. Xalapa, Veracruz, México.
- Christenson L. y Sims R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels and bioproducts. *Biotechnology Advances*. **29**: 686 – 702.
- Concas A., Lutz G.A., Pisu M. y Cao G., (2012). Experimental analysis and novel modeling of semi-batch photobioreactors operated with *Chlorella vulgaris* and fed with 100% (v/v) CO<sub>2</sub>. *Chemical Engineering Journal*. **213**: 203 – 213.
- De- Bashan L.E., Bashan Y., Moreno M., Lebsky V.K. y Bustillos J.J., (2002). Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell population size of the microalgae *Chlorella spp.* When co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can J. Microbiol.* 48: 21 – 514.
- Degen J., Uebele A., Retze A., Schmid-Staiger U. y Trösch W. (2001). A novel *airlift* photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *Journal of Biotechnology*. **92**: 89-94.
- De Rijck G. y Schrevens E. (1997). Elemental bioavailability in nutrient solutions in relation to dissociation reactors. *J. Plant Nutr.* 20: 167 – 199.
- Doran, P.M. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press.
- Dreybodt W., Lauckner J., Zaihua L., Severson U. y Buhmann D. (1996). The kinetics of the reaction  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$  as one of the rate limiting steps for the dissolution of calcite in the system  $\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2-\text{CaCO}_3$ . *Geochim Cosmochim Acta*. **60**: 81- 3375
- Fernandes, B., Dragone, G., Teixeira A. y Vicente A. (2010). Light regime characterization in a photobioreactor for cultivation of microalgae with high starch content for bioethanol production. *Eng. Week*. Guimaraes. 11-15.

- Fogler H.S. (2001). Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas. Editorial. Prentice Hall. pp. 396-403.
- Galíndez M. J. y Ruiz O. N. (1994). Fundamentos biocinéticos para el diseño de procesos fermentativos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. pp 26-28.
- Genium (1999). Genium's handbook of safety, health and environmental data for common hazardous substances. New York: McGraw Hill.
- Giordano M., Norici A. y Hell R. (2005<sub>a</sub>). Sulfur and phytoplankton: acquisition, metabolism and impact on the environment. *New Phytol.* **166**: 82 – 371.
- Giordano M., Beardall J. y Raven J.A. (2005<sub>b</sub>). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu Rev. Plant Biol.* **56**: 99-131
- Graham L.E. y Wilcox L.W. (2000). Algae. Upper Saddle River New Jersey: Prentice Hall.
- Hammitt, J.K., Jain A.K., Adams J.L. y Webbles D.J. (1996). A welfare-based index for assessing environmental effects of greenhouse-gas emissions. *Nature.* **381**: 3-301
- Hanagata, N., Takeuchi T., Fukuju Y., Barnes D.J, y Karube I., (1992). Tolerance of microalgae to high CO<sub>2</sub> and high temperature. *Phytochemistry.* **31**: 3345-3348
- Hai-Feng J., Denise E.O., Santiago J.P. y Kisay L. (2008). Enhancement of Nitric Oxide Solubility using Fe(II)EDTA and Its Removal by Green Algae *Scenedesmus sp.* *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* **13**: 48-52
- Hillard R. M., (2004). Gas Chromatography: Lab Lessons. GOW-MAC Instrument Co. pp. 1.1.7 – 1.1.8
- Housecroft C.E. y Sharpe A.G. (2005). Inorganic chemistry. 2nd Edition. Essex (England): Pearson Education limited.

- Jansson C. y Northen T. (2010). Calcifying cyanobacteria – the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**: 1-7
- Jiang, Y., Zhang, W., Wang J., Chen, Y., Shen, S., y Liu, T. (2013). Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresourse Technology.* **128**: 359-364.
- Jin H.F., Santiago D.E.O., Park J. y Lee K., (2008). Enhancement of nitric oxide solubility using Fe(II)EDTA and its removal by green algae *Scenedesmus sp.* *Biotechnol Bioprocess. Eng.* **13**: 48 – 52.
- Johnson K.S., (1982). Carbon dioxide hydration and dehydration kinetics in seawater. *Limnol. Oceanogr.* **27**: 849 – 855.
- Johnston, H.S. (1992). Atmospheric ozone. *Annu Rev Phys Chem.* **43**: 1-31.
- Kanniche M., Gros-Bonnivard R., Jaud P., Valle-Marcos J., Amann J.M. y Bouallou C. (2010). Pre-combustion, post-combustion and oxy-combustion in thermal power plant for CO<sub>2</sub> capture. *Appl. Therm. Eng.* **30**: 53-62.
- Kumar A., Ergas S., Yua X., Sahu A., Zhang Q., Dewulf J., Malcata F.X. y Van Langenhove H., (2010). Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae; recent developments and future directions. *Trends Biotechnol.* **28**: 371 – 380.
- Kumar K., Dasgupta C. N., Nayak B., Lindblad P. y Das D., (2011). Review. Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using Green algae and cianobacteria. *Bioresourse Technology.* **102**: 4945 – 4953.
- Kurano N., Ikemoto H., Miyashita H., Hasegawa T., Hata H. y Miyachi S. (1995). Fixation and utilization of carbon-dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy Convers Manage.* **36**: 92 – 689.

- Kurvitz T. y Marta T. (1998). Agricultural NH<sub>3</sub> and NO<sub>x</sub> emissions in Canada. *Environ. Pollut.* **102**: 97-187.
- Lane T.W., Saito M.A., George G.N., Pickering I.J., Prince R.C. y Morei F.M.M. (2005). Isolation and preliminary characterization of cadmium carbonic anhydrase from a marine diatom. *Nature.* **435**: 42.
- Lee J., Jin-Suk L., Chul-Seung S., Soon-Chul P. y Seung-Wook K. (2000). Effects of NO and SO<sub>2</sub> on growth of highly CO<sub>2</sub> tolerant microalgae. *Microbial Biotechnol.* **10**: 43 – 338.
- Lehninger, A., (1987). Principios de Bioquímica. 2ªEd. pp. 619 - 620.
- Li W., Liu L., Chen W., Yu L., Li W. y Yu H. (2010). Calcium carbonate precipitation and crystal morphology induced by microbial carbonic anhydrase and other biological factors. *Process Biochem.* **45**:21-1017.
- Li F.F., Yang Z.H., Zeng R., Yang G., Chang X., Yan J.B., *et al.* (2011). Microalgae capture of CO<sub>2</sub> from actual flue gas discharged from a combustion chamber. *Ind. Eng. Chem. Res.* **50**: 502-6496
- Lockhart H.B. y Blakeley R.V. (1975). Aerobic photodegradation on Fe(III)-(Ethylenedinitrilo)tetraacetate (Ferric EDTA). *Environ Sci. Technol.* **9**: 1035
- López, M.T., Zuk, M., Garibay, V., Tzintzun, G., Iniestra, R. y Fernández, A. (2004). Health impacts from plant emissions in Mexico. *Atmospheric Environment.* **39**:1199-120.
- Maeda, K., Owada, M., Kimura, N., Omata, K. y Karube, I. (1995). CO<sub>2</sub> fixation from flue gas on coal fired thermal power plant by microalgae. *Energy Converts.* **36**:717-720.
- Mallick N., Rai L.C., Mohn F.H. y Soeder C.J. (1999). Studies on nitric oxide (NO) formation by the green algae *Scenedesmus obliquus* and the diazotrophic cyanobacteria *Anabaena doliolum*. *Chemosphere.* **39**: 10-1601.

- Manahan S.E. (2007). Introducción a la Química Ambiental. Editorial Reverté. pp. 409 – 412.
- Mata M.T., Martins A.A. y Caetano N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sustain Energy Rev.* **14**: 32 – 217.
- Medina, J.A., Piña, V.P., Nieves, S.M., Arzola, G.J.F. y Guerrero, I.M. (2012). La importancia de las microalgas. CONABIO. *Biodiversitas.* **103**: 1-5
- Merker, G.P., Otto F., Schwarz C. y Gunnar S. (2006). Simulating combustion and pollutant formation for engine-development. Berlin: Springer-Verlag.
- Metz B., Davidson O., De Coninck H., Loos M. y Meyer I. (2005). IPCC special report on carbon dioxide capture and storage. Cambridge University Press.
- Mikhodyuk O.S., Zavarzin G.A. y Ivanovsky R.N. (2008). Transport systems for carbonate in the extremely natronophilic cyanobacterium *Eubhalothece sp.* *Biomed Life Sci.* **77**: 8 – 412.
- Miranda K.M., Espey M.G. y Wink D.A., (2001). A rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. Nitric Oxide. *Biology and Chemistry.* **5**: 62-71.
- Miyairi, S. (1995). CO<sub>2</sub> assimilation in a thermophilic cyanobacterium. *Energy Conver.* **36**:763-766.
- Morais, M.G. y Costa J.A.V. (2007). Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Convers Manage.* **48**:73-2169
- Nagase H., Yoshihara K., Eguchi K., Yokota Y., Hirata K. y Miyamoto K. (1997). Characteristics of biological NO<sub>x</sub> removal from flue gas in a *Dunaliella tertiolecta* culture system. *J. Ferment Bioeng.* **83**: 5 – 461.



- Nagase H., Yoshihara K., Eguchi K., Okamoto Y., Murasaki S., Yamashita R., *et al.* (2001). Uptake pathway and continuous removal of nitric oxide from flue gas using microalgae. *Biochem Eng.* **7**: 6-241.
- Niessen W.R. (2002). Combustion and incineration processes, 3<sup>rd</sup> ed. New York: Marcel Dekker Inc.
- Olguín E. J., (2013). International Training Course. The use of microalgae for the removal of pollutants and for the production of biofuels. Xalapa, Veracruz, México.
- Oliveria R. K., (2011). Gas Chromatography: A Slideshow Course. Disponible en [www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com)
- Perry R. H. y Chilton C.H (1973). Chemical Engineers' Handbook. Ed McGraw-Hill KOGAKUSHA, LTD. P. 3-18
- Perrin D.D., (1972). Dissociation Constants of Inorganic Acids and Bases in Aqueous Solution. Butterworths, London
- Posten C., (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng Life Sci.* **9**: 165 – 177.
- Radmann, E.M., Camerini F.V., Santos T.D. y Vieira Costa J.A. (2011). Isolation and application of SO<sub>x</sub> and NO<sub>x</sub> resistant microalgae in biofixation of CO<sub>2</sub> from thermoelectricity plants. *Energy Conversion and Management.***52**: 3132-3136.
- Rubio F.C., Camacho F.G., Sevilla J.M.F., Chisti Y. y Grima E.M. (2003). A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnol. Bioeng.* **81**: 4509-473
- Santiago DEO, Jin H.F. y Lee K., (2010). The influence of ferrous-complexed EDTA as solubilization agent and its auto-regeneration on the removal of nitric oxide gas through the culture of green alga *Scenedesmus sp.* *Process Chem.* **45**: 53 – 149.

- Shalska, K., Miller J.S. y Ledakowicz, S. (2010). Trend NO<sub>x</sub> abatement: A review. *Sci Total Environ.* **408**: 89-3976
- Secretaría de Energía (SENER). Sistema de Información Energética. (2012). Disponible en [www.sie.energía.gob.mx](http://www.sie.energía.gob.mx)
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2012). Inventario Nacional de Emisiones de México 2005. INE. México
- Siegenthaler, U., Stocker, T.F., Monin, E., Lüthi, D., Schwander, J., Stauffer, B., *et al.* (2005). Stable carbon cycle-climate relationship during the late Pleistocene. *Science*. **310**: 7 – 1313.
- Schmidt G.A., Ruedy R.A., Miller R.L. y Lacis A.A. (2010). Attribution of the present-day total greenhouse effect. *J. Geophys. Res.* **115**:D20106.
- Smith A.D. (1997). Oxford dictionary of biochemistry and molecular Biology. Oxford. New York: Oxford University Press.
- Smith J.M. (1991). Ingeniería de la cinética química. Editorial McGraw-Hill. pp. 488 – 493.
- Stumm W. y Morgan J.J. (1981). Aquatic Chemistry. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons. Sultemeyer D., Rinast K.A. The CO<sub>2</sub> permeability of the plasmalemma of *Chlamydomonas reinhardtii*; mass-spectrometric 18O-exchange measurements from 13C182 in suspensión of carbonic-anhydrase-loaded plasma membrane vesicles. 68- 358 p.
- Sun j., Zhang X., Broderick M. y Fein H., (2003). Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors*. **3**: 276-284.
- Torzillo G., Pushparaj B., Masojidek J. y Vonshak A. (2003). Biological constraints in algal biotechnology. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **8**: 338 – 348.

- Wang J., Yang S.L., Cong W. y Cai Zh. L., (2003). *Chin J. Proc. Eng.* **3**: 141.
- Wang H., Wu Z., Liu Y. y Sheng Z. (2008). The characterization of ZnO-anatase-rutile three component semiconductor and enhanced photocatalytic activity of nitrogen oxides. *J. Mol Catal. A Chem.* **287**: 81 – 287.
- Weil E.D. y Sandler S.R. (1997). Sulfur Compounds. In: Kroschwitz J.I. Howe-Grant M. editors. *Kirk-Othmer encyclopedia of Chemical Technology*. New York: John Wiley & Sons; 275-340 p.
- Welch M.J., Lipton J.F. y Seck J.A., (1969). Tracer studies with radioactive oxygen-15. Exchange between carbon dioxide and water. *J. Phys. Chem.* **73**: 3351.
- Welty J.R., Wicks C.E. y Wilson R.E. (1994). *Fundamentos de Transferencia de momento, calor y masa*. Editorial Limusa S.A. de C.V. p. 810.
- Wen J., Sun Y., Li B Sh., Zhu R. X., Jiang Y. J., Wen H Ch. y Zhang Y. K., (2010) *Microbiol China.* **37**: 1721.
- Westerhoff, P., Hu, Q., Esparza, S. M. y Vermaas, W. (2010). Growth parameters of microalgae tolerant to high levels of carbon dioxide in batch and continuous-flow photobiorreactors. *Environ Technol.* **31**: 523-532.
- Yang S., Wang J., Cong W., Cai Z. y Ouyang F. (2004). Effects of bisulfate and sulfite on the microalga *Botryococcus braunii*. *Enzyme Microb Technol.* **35**: 46 – 50.
- Yang S., Chen Ch. Y., Zhao Sh. L., Niu Y. H. y Li L., (2006) *Yunan Chem Technol*, **33**: 49

## APÉNDICES

### APÉNDICE A

#### Obtención de los gases CO<sub>2</sub>, NO y SO<sub>2</sub>

##### Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>)

Se compró un cilindro de CO<sub>2</sub> (INFRA) puro.

##### Óxido Nítrico (NO)

El NO se obtuvo en el laboratorio y se almacenó en un recipiente de vidrio libre de humedad.

La obtención del NO se llevó a cabo a partir de la siguiente reacción:

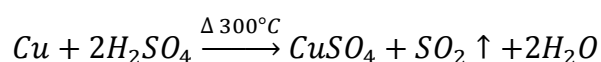


El procedimiento fue el siguiente:

En un reactor de vidrio se colocó NaNO<sub>2</sub> disuelto en la mínima cantidad de agua. Este reactor se conectó a un recipiente de vidrio, al que previamente se le había hecho vacío. Para que la reacción se llevara a cabo, se adicionó FeSO<sub>4</sub> disuelto en ácido (poco a poco) por la parte superior del reactor. Para poder apreciar la formación de NO, el sistema de reacción tenía una salida alterna que daba a un recipiente con agua desionizada. Así, cuando empezó a burbujear gas, y midiéndose la caída del pH del agua, se confirmó la presencia del gas. Para evitar que el gas formado entrara con humedad al recipiente con vacío, a la salida del reactor estaba conectada una trampa de humedad.

##### Dióxido de Azufre (SO<sub>2</sub>)

La producción de SO<sub>2</sub> se llevó a cabo a partir de la siguiente reacción:



El procedimiento fue el siguiente:

En un reactor de vidrio se colocó Cu metálico con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Este reactor se conectó a un recipiente de vidrio, al que previamente se le había hecho vacío. Para que la reacción se llevara a cabo, el reactor se calentó hasta los 300°C. Para poder apreciar la formación de SO<sub>2</sub>, el sistema de reacción tenía una salida alterna que daba a un recipiente con agua desionizada. Así, cuando empezó a burbujear gas, y midiéndose la caída del pH del agua, se confirmó la presencia del gas. Para evitar que el gas formado entrara con humedad al recipiente con vacío, a la salida del reactor estaba conectada una trampa de humedad.

### **Elaboración y almacenamiento de las mezclas**

Para la elaboración de las mezclas gaseosas se tomó la fracción correspondiente de cada gas (NO y SO<sub>2</sub>, calculada) y se inyectaron en dos tanques de gas estacionario con capacidad de 300 L (cada uno), a los que se les había hecho vacío. Posteriormente se cargaron con CO<sub>2</sub> (INFRA) hasta llegar a una presión de 0.96 kg/cm<sup>2</sup>, que corresponde al 12% CO<sub>2</sub> (v/v) y finalmente se llenaron con aire que provenía de un compresor para llegar a una presión total de 8 kg/cm<sup>2</sup>. Los tanques estaban conectados a filtros para aire comprimido, que a su vez, estaban conectados a la línea de alimentación de los fotobiorreactores.

## **APÉNDICE B**

### **Análisis de CO<sub>2</sub> por Cromatografía Gaseosa**

La cromatografía de gases es una técnica utilizada para la separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles. La muestra es vaporizada e introducida en un flujo de un gas apropiado llamado la fase móvil o gas acarreador. El flujo de gas con la muestra vaporizada pasa a través de un tubo que contiene la fase estacionaria dentro de una columna cromatográfica, donde ocurre la separación de la mezcla.

La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente, una película de líquido no volátil, soportado en un sólido inerte o en la pared interna de un tubo. Las sustancias separadas abandonan la columna en el gas acarreador y pasan a través de un detector, un dispositivo que genera una señal eléctrica proporcional a la cantidad del material eluido. El registro de esta señal como función del tiempo es el

cromatograma, siendo que cada sustancia aparezca en el cromatograma como un área proporcional a su masa, permitiendo un análisis cuantitativo (Oliveria, 2011).

En este estudio se utilizó un cromatógrafo de gases Gow-Mac, que utiliza un detector de conductividad térmica (TCD).

El detector de TCD responde con una diferencia de milivoltaje, la presencia de una muestra midiendo su conductividad térmica y comparándola con la conductividad térmica del gas acarreador. Consiste de dos o cuatro filamentos colocados en estrechas cavidades dentro de un bloque de metal que les sirve de piscina de calentamiento.

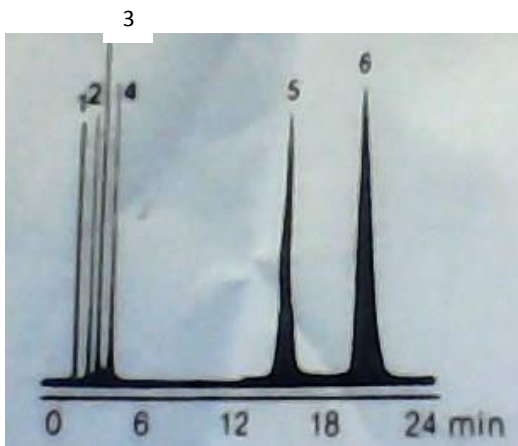
La mitad de los filamentos son expuestos solamente al gas acarreador y sirven de referencia. Los otros dos son expuestos al efluente que proviene de la columna y son contactados por los componentes de la muestra mientras estos eluyen. Una corriente directa es utilizada para calentarlos a una temperatura arriba de la temperatura del bloque. Su resistencia varía directamente con su temperatura, la cual depende de la naturaleza del gas contenido en las cavidades. Si un gas con elevada conductividad térmica, como el helio, es utilizado como gas acarreador, los filamentos serán enfriados y la resistencia será relativamente baja. La presencia de vapor de la muestra con una baja conductividad térmica causará que la temperatura y la resistencia se eleven.

Para detectar cambios en la resistencia, los filamentos están colocados dentro de un puente de Wheastone. Cuando ninguna muestra está presente, los filamentos están bañados en helio y el zero en el control puede ser ajustado para balancear el puente (se fija cromatográficamente la línea base). Cuando una muestra eluye y pasa sobre los filamentos, su resistencia se eleva, el puente se desbalancea y un voltaje es registrado como una señal que da lugar al cromatograma (Hillard, 2004).

## **APÉNDICE C**

### **Elaboración del método cromatográfico para la identificación de CO<sub>2</sub>**

A partir de una mezcla de gases (H<sub>2</sub>, aire, CO, CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, CO<sub>2</sub>) de concentración conocida (INFRA), se determinó el tiempo de residencia del CO<sub>2</sub> en el cromatógrafo de gases Gow-Mac. Éste utiliza un detector de conductividad térmica (TCD). La columna de separación que se utilizó fue una columna empacada de sílica-gel de 18 ft por 1/8 in de diámetro (Altech). La temperatura de la columna fue de 52°C, y se manejó un flujo de Nitrógeno (gas acarreador) de 30 ml/min. El tiempo de residencia del CO<sub>2</sub> fue de 18 min.



Gases

1. Hidrógeno
2. Aire
3. Monóxido de Carbono
4. Metano
5. Etano
6. Dióxido de carbono

Columna: 18 ft x 1/8 "SS  
 Empaque: Sílica gel, 60/80  
 Temperatura: 60°C  
 Flujo de gas acarreador: Helio, 22 ml/min

Figura 1C. Cromatograma de referencia.

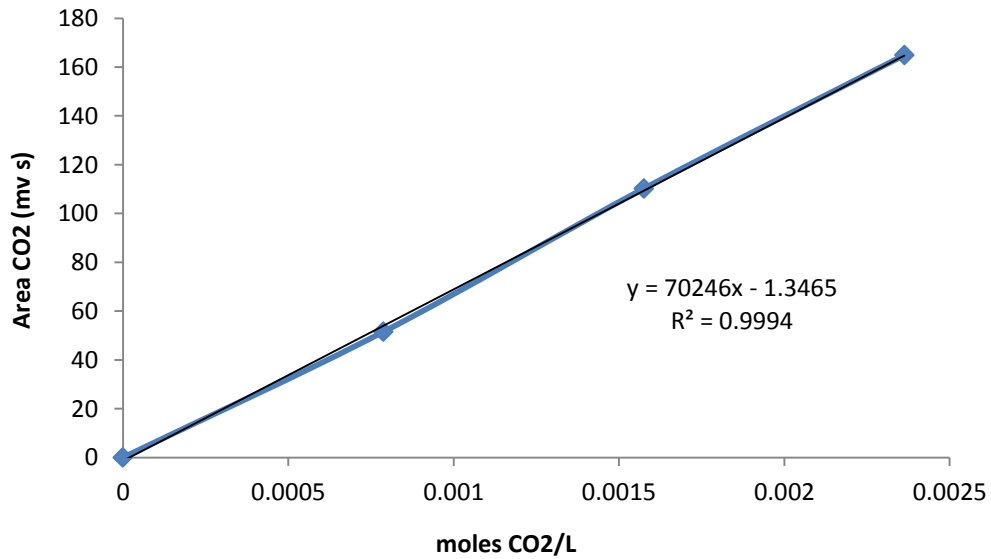


Figura 2C. Curva de calibración para la determinación cromatográfica de CO<sub>2</sub>

## APÉNDICE D

### Determinación de Biomasa por Densidad Óptica

Con el fin de determinar la mejor señal para evaluar la concentración de biomasa se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro visible Spectronic Instruments modelo 21D a varias longitudes de onda (Figura 1D) y se encontró un máximo a 678 nm.

Las lecturas obtenidas se interpolaron en una curva de calibración (Figura 2D) que relaciona la densidad óptica con el peso seco de *S. dimorphus*.

El peso seco de la microalga se midió filtrando alícuotas de 10 mL a través de filtros de Papel Watman No. CF/A de 1.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Cada filtro se secó a 50°C hasta llegar a peso constante. La relación entre la densidad óptica y la concentración de biomasa de *S. dimorphus* se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$y = 1.6795x + 0.0306 \quad (R^2 = 0.9995)$$

Donde  $y$  se refiere a la concentración de biomasa (g/L) y  $x$  a la densidad óptica ( $\text{OD}_{678}$ ).

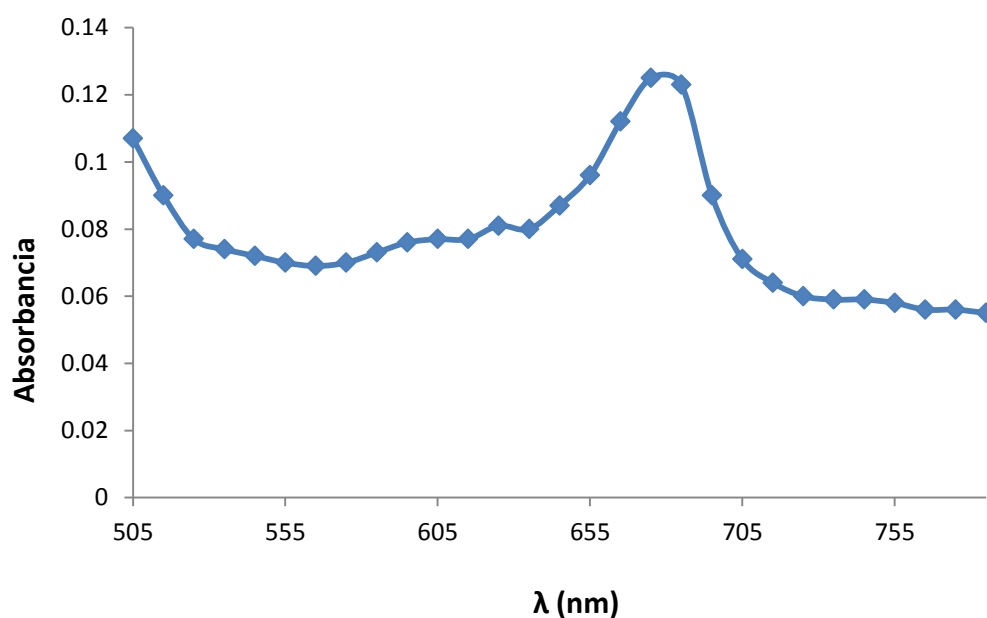


Figura 1D. Espectro visible para la determinación de biomasa por Densidad Óptica



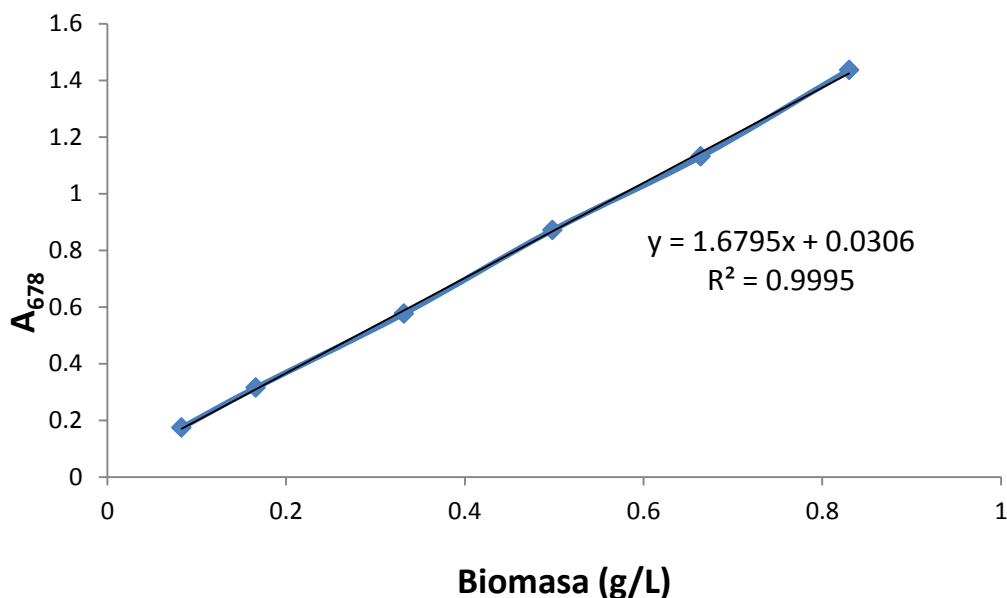


Figura 2D. Curva de calibración para la determinación de biomasa por Densidad Óptica.

## APÉNDICE E

### Determinación de Alcalinidad

La alcalinidad de un agua es su capacidad para neutralizar ácidos y constituye la suma de todas las bases titulables. La alcalinidad de muchas aguas de superficie depende primordialmente de su contenido en carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, por lo que suele tomarse como una indicación de estos componentes (APHA, 1992).

## APÉNDICE F

### Determinación de $\text{NO}_2^-$ y $\text{NO}_3^-$ , utilizando el reactivo de Griess

En esta determinación, los nitritos primero son tratados con un reactivo de diazotación, la sulfanilamida (SA), en medio ácido para formar una sal de diazonio transitoria. Este intermediario reacciona con un reactivo acoplante, el N-naftil-etilendiamino (NED), para formar un compuesto azo estable (Figura 1F), que se puede medir a 540 nm (Sun *et al.*, 2003). Sin embargo, la reacción convencional tiene limitaciones en lo que respecta a la sensibilidad (1 – 5  $\mu\text{M}$ ) y la incapacidad de detectar nitratos. Para la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  se utilizó el  $\text{VCl}_3$  (Miranda *et al.*, 2001)

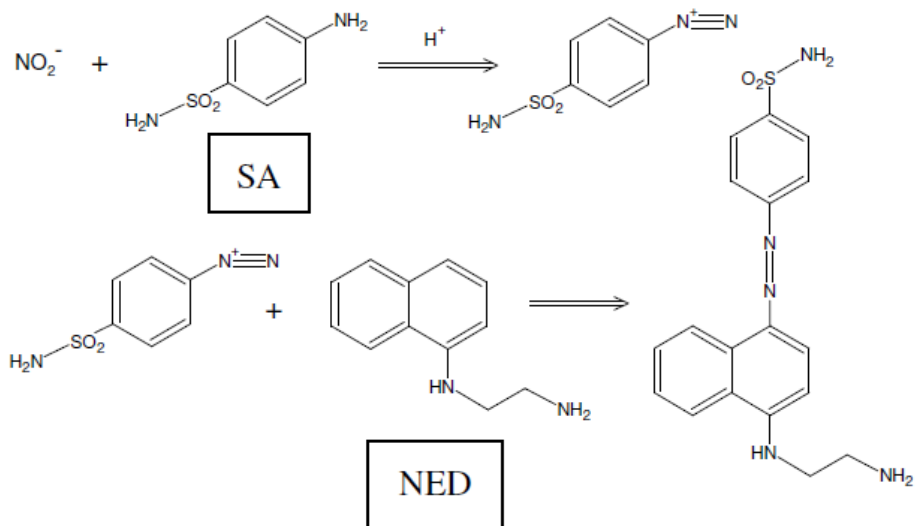


Figura 1F. Reacción de Griess para la determinación de  $\text{NO}_2^-$

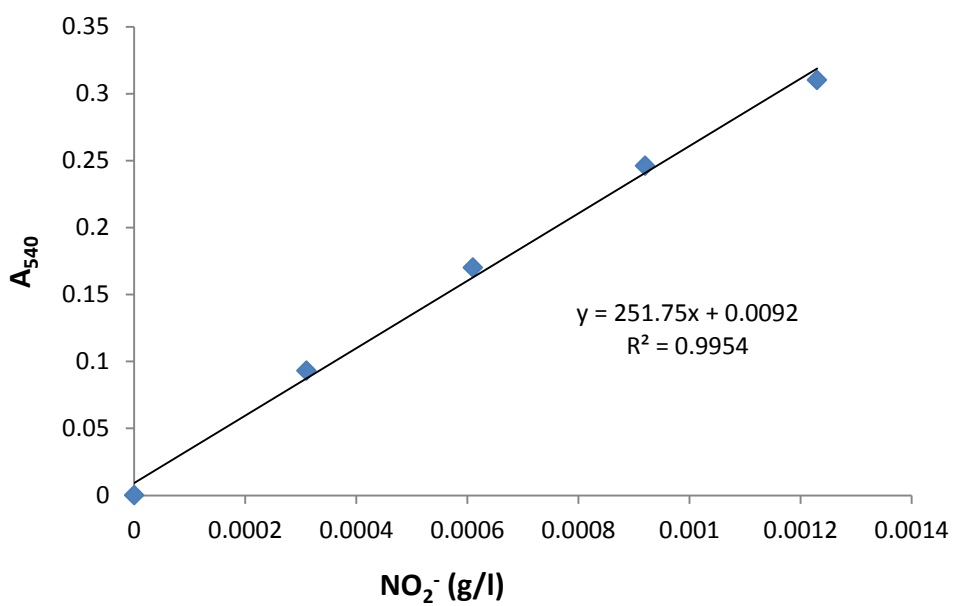
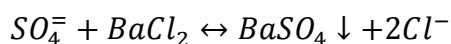


Figura 2F. Curva de calibración para la determinación de  $\text{NO}_2^-$

## APÉNDICE G

### Determinación de $\text{SO}_4^{2-}$

El ion sulfato precipita con  $\text{BaCl}_2$ , en un medio ácido ( $\text{HCl}$ ), formando cristales de  $\text{BaSO}_4$  de tamaño uniforme. La reacción es la siguiente:



La absorbancia de la suspensión del sulfato de bario se puede medir con un espectrofotómetro. La concentración del ion sulfato se determina por comparación de la lectura con una curva patrón (APHA, 1992).

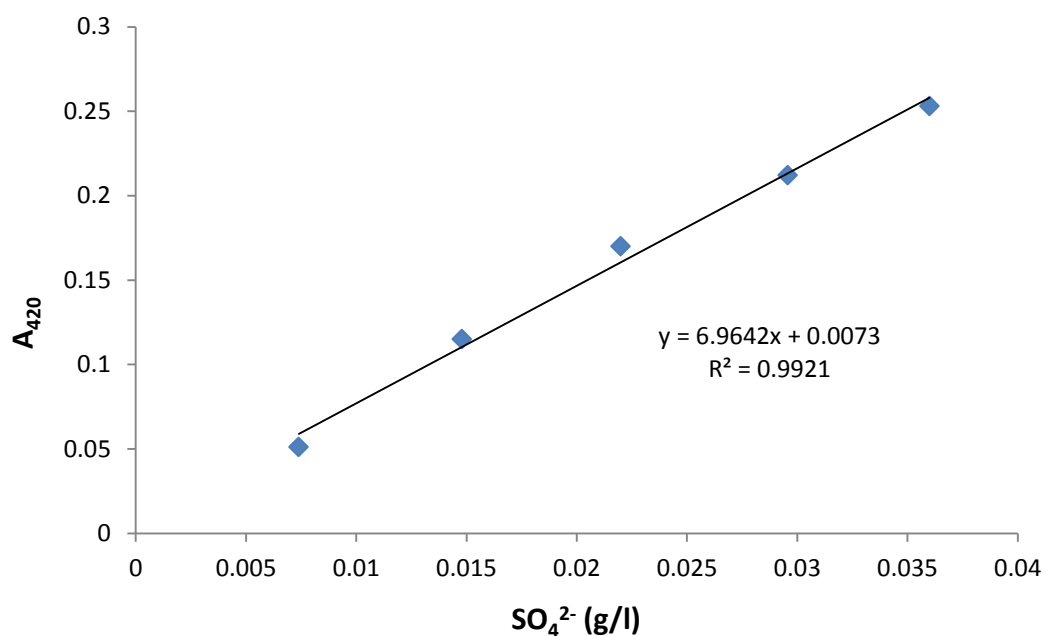


Figura 1G. Curva de Calibración para la determinación de  $\text{SO}_4^{2-}$