

DISEÑO, MONTAJE Y CARACTERIZACIÓN  
DE FOTOBIORREACTORES *airlift*  
PARA EL CULTIVO DE LA MICROALGA  
*Chlorella sorokiniana*

Por  
Miguel Fernández Ángel

Trabajo de grado  
para optar al título de Ingeniero de Procesos

Asesor  
Alex Armando Saez Vega

Universidad EAFIT  
Departamento de Ingeniería de Procesos  
Medellín Colombia  
octubre del 2013

Nota de aceptación

---

---

---

Jurado

---

Jurado

---

Jurado

---

Jurado

---

Jurado

---

# Agradecimientos

Primero debo agradecer a mis padres por las grandes oportunidades que me han brindado, por su paciencia, sacrificio y constante apoyo. Ellos me han apoyado en diversos intereses, ofreciéndome además la posibilidad de viajar y aprender otro idioma.

Gracias a los profesores de la carrera que han sabido, más que dictar clase, despertar interés y pasión por mundos del conocimiento que no sospechaba que existían. Algunos de ellos son: Kevin G. Molina, Juan David Ortega, Luisa F. Posada.

Especiales agradecimientos al grupo de investigación Grial cuyos integrantes, de manera oportuna y desinteresada, me ayudaron con mi proyecto, en especial a Daniel Pérez y Juan Pablo Díez. Ana Y. Cárdenas jugó un papel esencial en este proyecto al compartir invaluable habilidades y conocimientos. Gracias a mi asesor Alex A. Saez por su paciencia, por las oportunidades y por la posición de libertad pero de responsabilidad que me otorgó.

Frecuentemente olvidados pero no por eso menos importantes, todos los compañeros de la carrera, gracias a ellos que con gran sentido de pertenencia y del compartir hacen de la universidad EAFIT uno de los mejores entornos para estudiar en Colombia y en el mundo.

Reconozco en la universidad EAFIT, una institución de gran calidad, orden y generosidad. Sus profesores y técnicos son personas de excelencia y vocación.

# Índice general

Agradecimientos	II
Índice general	IV
Índice de figuras	VI
Índice de cuadros	1
Resumen	2
<b>1. Introducción</b>	<b>4</b>
<b>2. Planteamiento del problema</b>	<b>6</b>
<b>3. Marco teórico</b>	<b>8</b>
3.1. Microalgas y <i>Chlorella sorokiniana</i> . . . . .	8
3.2. Diseño de fotobioreactores . . . . .	11
3.3. Fotobiorreactores <i>airlift</i> . . . . .	13
3.3.1. Configuraciones de reactores <i>airlift</i> . . . . .	14
3.3.2. Ventajas y desventajas de los reactores <i>airlift</i> . . . . .	15
<b>4. Objetivos</b>	<b>17</b>
4.1. Objetivo general . . . . .	17
4.2. Objetivos específicos . . . . .	17
<b>5. Diseño y montaje de una configuración de fotobiorreactor <i>airlift</i></b>	<b>18</b>
5.1. Ecuaciones de diseño . . . . .	18
5.1.1. Variables de diseño . . . . .	18
5.1.2. Variables de operación . . . . .	18
5.1.3. Variables de respuesta . . . . .	19
5.1.4. Relaciones de diseño y ecuaciones . . . . .	19
5.1.5. Medidas y relaciones del modelo construido . . . . .	20
5.2. Materiales de construcción . . . . .	22
5.3. Automatización . . . . .	25
5.3.1. Autómatas programables (PLC) . . . . .	25

<b>6. Evaluación de la configuración de fotobiorreactor construida</b>	<b>27</b>
6.1. Diseño de experimento . . . . .	27
6.2. Curvas de calibración . . . . .	29
6.2.1. Metodología para la construcción de las curvas de calibración	29
6.2.2. Conteo de células en cámara de Neubauer . . . . .	30
6.2.3. Peso seco de biomاسas en balanzas de humedad . . . . .	31
6.2.4. Densidad óptica en espectrofotómetro . . . . .	31
6.2.5. Curvas de calibración escogidas . . . . .	32
6.3. Cinéticas de crecimiento . . . . .	35
6.3.1. Medio con fertilizante . . . . .	36
6.3.2. Medio Bristol . . . . .	37
6.3.3. Burbujeo alto . . . . .	39
6.4. Apreciaciones cualitativas del diseño . . . . .	42
<b>7. Conclusiones</b>	<b>43</b>
<b>8. Recomendaciones</b>	<b>45</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>47</b>

# Índice de figuras

3.1. Micrografías de <i>Chlorella sorokiniana</i> . . . . .	9
3.2. El diseño de reactores químicos, un reto multidisciplinario. . . . .	11
3.3. Diferentes modelos de fotobiorreactores [Contreras et al., 2003] . . . . .	11
3.4. Partes características de un reactor <i>airlift</i> [Doran, 1998]. . . . .	13
3.5. Diferentes modelos de reactores <i>airlift</i> [Contreras et al., 2003] y [Shah et al., 1982] . . . . .	14
3.6. Configuraciones especiales de reactores <i>airlift</i> [Merchuk and Gluz, 2010] . . . . .	15
5.1. Planos del modelo construido . . . . .	21
5.2. Prototipos construidos y funcionando. . . . .	21
5.3. Cilindro en polimetilmetacrilato opacados por la luz UV y compuestos químicos. . . . .	24
5.4. Diferentes modelos de micro-PLC. . . . .	26
6.1. Iluminación de los reactores <i>airlift</i> . . . . .	28
6.2. Toma de muestra en la parte superior de la columna de burbujeo . . . . .	28
6.3. Procedimiento para la construcción de la curvas de calibración . . . . .	30
6.4. Cámara de Neubauer . . . . .	30
6.5. Microscopio con cámara para micrografías y conteo de células. . . . .	31
6.6. Balanzas de humedad y y filtros. . . . .	31
6.7. Barrido espectral desde 300 a 700nm de un cultivo de <i>Chlorella sorokiniana</i> . . . . .	32
6.8. Colorímetro y celda . . . . .	32
6.9. Curva de calibración que relaciona la densidad celular con la densidad óptica. . . . .	33
6.10. Curva de calibración que relaciona el peso seco de biomasa con la densidad óptica. . . . .	34
6.11. Estudio fotográfico de una cinética de crecimiento . . . . .	35
6.12. Cinéticas de crecimiento en medio con fertilizante a tres niveles de luz diferentes . . . . .	36
6.13. Réplica cinéticas de crecimiento en medio con fertilizante a tres niveles de luz diferentes . . . . .	37
6.14. Cinéticas de crecimiento en medio Bristol a tres niveles de luz diferentes. . . . .	37
6.15. Réplica cinéticas de crecimiento en medio Bristol a tres niveles de luz diferentes. . . . .	38
6.16. Comparación de rangos LSD, luz . . . . .	39

6.17. Cinéticas de crecimiento en medio con fertilizante en un nivel de burbujeo alto . . . . .	39
6.18. Réplica cinéticas de crecimiento en medio con fertilizante en un nivel de burbujeo alto . . . . .	40
6.19. Comparación de rangos LSD, burbujeo . . . . .	41
6.20. Adherencia y sedimentación de la microalga <i>Chlorella sorokiniana</i>	42

# Índice de cuadros

3.1.	Contenido lipídico de algunas cepas de microalgas [Chisti, 2007] .	9
3.2.	Posibles configuraciones de las diferentes partes de un reactor <i>airlift</i> [Merchuk and Gluz, 2010] . . . . .	15
5.1.	Relaciones geométricas de reactores <i>airlift</i> de tubos concéntricos escogidas por diferentes autores [Lizardi, 2011] . . . . .	19
5.2.	Dimensiones y relaciones del modelo de <i>airlift</i> construido. . . . .	20
5.3.	Materiales transparentes y sus características . . . . .	23
5.4.	Programación de los micro-PLC de la serie alpha de Mitsubishi .	26
6.1.	Variables del primer experimento en bloques completos al azar para evaluar . . . . .	27
6.2.	Variables del segundo experimento unifactorial para evaluar nivel de burbujeo . . . . .	27
6.3.	Medios de cultivo utilizando en las cinéticas del primer experimento	28
6.4.	Datos curvas de calibración . . . . .	33
6.5.	Densidad celular máxima alcanzada para diferentes niveles de luz	38
6.6.	Tabla ANOVA y test de rangos múltiples para dos niveles de luz .	38
6.7.	Densidad celular máxima alcanzada para dos niveles de burbujeo .	40
6.8.	Productividades promedio a los 15 días para dos niveles de burbujeo	40
6.9.	Tabla ANOVA y test de rangos múltiples para dos niveles de burbujeo	41

# Resumen

Este trabajo presenta el diseño, el montaje, la operación y evaluación de una configuración de fotobiorreactor *airlift* de tubos concéntricos para el cultivo de la microalga *Chlorella sorokiniana*.

El diseño se encargó del dimensionamiento del modelo de *airlift*. Obedeciendo también a consideraciones de sujeción y de mantenimiento, se optó por construir 3 ejemplares de 9L de capacidad nominal, 51cm de alto y 17cm de diámetro. Un cilindro interno y concéntrico de 6.5cm de diámetro, perforado en su parte inferior actuó como columna de burbujeo. Estas dimensiones le otorgaron al modelo construido una relación altura/diámetro ( $h/D$ ) de 3, y una relación área *downcomer*/área *riser* ( $A_d/A_r$ ) de 7. Los anteriores coeficientes delataron un montaje de reactor “chato” con un *downcomer* sobredimensionado.

El montaje de fotobiorreactores *airlift* se realizó con láminas de polimetilmetacrilato de 5mm de espesor. Este material fue seleccionado por sus amplias posibilidades de termoformado, su baja densidad (1.19 g/mL), su alta transparencia (93 %) y su disponibilidad en la ciudad de Medellín.

Para la operación de los reactores así construidos, se indagó sobre sus necesidades de automatización. Los micro-PLC fueron escogidos como la mejor alternativa tecnológica de control por su robustez, fiabilidad, adaptadas posibilidades de programación y precio. Se cableó un AL2-14MR-D<sup>TM</sup> de Mitsubishi® en sus salidas en relés para la temporización de la iluminación y de la soplante.

Los reactores fueron evaluados con el análisis de las cinéticas de crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* a diferentes condiciones de luz, medio de cultivo y burbujeo. Se encontró que con niveles de luz de 40W (para luz blanca y de colores) se lograban mayores productividades promedio a los 15 días de hasta 2.86E+04 células día<sup>-1</sup>  $\mu L^{-1}$  y mayores densidades celulares máximas de hasta 5.70E+05 células  $\mu L^{-1}$  que con los tratamientos con 20W de luz blanca.

Las cinéticas obtenidas en medio con fertilizante triple 18 alcanzaron densidades celulares superiores a las de medio Bristol. Las cinéticas desarrolladas en medio Bristol presentaron un declive muy marcado a los 25 días, frente a las cinéticas más duraderas generadas en el medio con fertilizante. No se constataron cambios morfológicos evidentes de un medio de cultivo a otro.

Niveles de burbujeo altos no llevaron a mayores productividades o concentraciones celulares. Por otro lado, la operación de estos fotobiorreactores llevó a considerar la base de los reactores *airlift* como una zona crítica, a la que debe prestársele mucha atención, por cuanto allí se presentan puntos muertos y sedimentaciones.

## Palabras claves

Fotobiorreactores, reactores *airlift*, microalgas, *Chlorella sorokiniana*, micro-PLC, cinéticas de crecimiento

# Capítulo 1

## Introducción

Las inminentes necesidades de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y de hallar sistemas de producción más limpios, motivan y justifican el presente trabajo. Ya son muchos los autores que han advertido sobre estos problemas, como es el caso de [Chisti, 2007] y [Dah-Wei et al., 2012] para introducir sus trabajos sobre microalgas. Para iniciar este estudio se seguirá ese mismo ejemplo, mostrando también que el cultivo de microalgas se perfila como una posible respuesta biotecnológica.

En el 2012, 870 millones de personas sufrieron de hambre y 2,6 millones de niños menores de 5 años (un tercio del total global) murieron por desnutrición [FAO, 2012] [Unicef, 2013]. Como si el hambre no fuera poca, el 40 % del maíz que se cultiva en los Estados Unidos se destina a la producción de bioetanol para ser usado como aditivo en la gasolina [AmericaEconomia, 2013]. Por otro lado, el biodiesel también contribuye al hambre mundial y no es ninguna panacea: las grandes extensiones de cultivo de palma compiten con los cultivos de alimentos exigiendo la tala de nuevas áreas forestales [Sachs, 2007]. Confrontando la situación, algunos científicos han encontrado en las microalgas una alternativa para la alimentación humana y animal. En efecto, algunas microalgas, como la *spirulina* o *scenedesmus sp*, son consideradas alimentos funcionales debido a que contienen cantidades apreciables de proteínas, vitaminas y ácidos grasos [Quevedo et al., 2008].

Actualmente, el barril de petróleo WTI ronda los 105 us\$ [PrecioPetroleo, 2013]. La comunidad mundial perdió la esperanza en una baja del precio y debido a su fuerte dependencia, atraviesa por una crisis energética. El petróleo se encuentra por todas partes, desde los plásticos utilizados en los envases o en los aparatos eléctricos, hasta los fertilizantes utilizados en la agricultura. La posibilidad de producir biodiesel, hidrógeno o productos de alto valor agregado a partir de microalgas es una realidad científica que se está estudiando mundialmente y podría aliviar la dependencia al combustible fósil [Benemann, 2000][Chisti, 2007][Huang et al., 2010].

Se le atribuye al aumento de gases de efecto invernadero en la atmósfera, en especial la de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), el fenómeno del calentamiento global. Se estima que la concentración atmosférica de  $CO_2$  en el 2011 es de 391 ppmv y que ésta no ha dejado de aumentar desde el Paleolítico y en particular en estos últimos

cien años [Kumar and Das, 2012][Wang et al., 2008]. La preocupación es tal, que en el 2005 entró en vigor el protocolo de Kyoto, el cual compromete a algunos países a disminuir sus emisiones de gases de efecto invernadero. Las microalgas parecen una vez más aportar elementos de respuesta, pues son organismos fotosintéticos que asimilan  $CO_2$  como fuente de carbono con una eficiencia diez veces mayor al de las plantas superiores [Dah-Wei et al., 2012].

No se quiere defender la exagerada pretensión de salvar al mundo con microalgas, sino de poner en consideración el hecho de que su cultivo, como ya se dijo, se perfila como una alternativa biotecnológica para mitigar las emisiones humanas de  $CO_2$  y para crear procesos con productos de alto valor. En la dirección de concretar estas potencialidades, este trabajo se ocupa del biorreactor, como corazón del proceso biotecnológico, y se interesa con especial atención en el diseño, montaje y operación de una configuración de fotobiorreactor *airlift* de tubos concéntricos para el cultivo de la microalga *Chlorella sorokiniana*.

Este trabajo inicia con un marco teórico que introduce los dos grandes temas que lo definen: las microalgas y el diseño de fotobiorreactores *airlift*. Son expuestas las ventajas y exigencias metabólicas de las microalgas con miras a ser atendidas por el diseño y operación del fotobiorreactor. Se exponen las ventajas de los fotobiorreactores *airlifts* con respecto a otros modelos y las razones por las que se escogió ahondar en su estudio.

El diseño de una configuración de fotobiorreactor *airlift* tomó en cuenta consideraciones heurísticas y ecuaciones de diseño propuestas por [Doran, 1998], [Contreras et al., 2003] y [Shah et al., 1982]. El montaje de los fotobiorreactores tuvo en cuenta aspectos como: la selección de materiales, las necesidades de automatización y consideraciones prácticas sobre su limpieza y mantenimiento.

El trabajo concluyó con la evaluación del montaje construido mediante el registro de las cinéticas de crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en su interior a diferentes niveles de luz, burbujeo y de medio de cultivo.

# Capítulo 2

## Planteamiento del problema

En la década de 1950, se divulgó que el cultivo masivo de microalgas en agua con nutrientes y luz podría ser una buena alternativa para producir proteínas de consumo humano [Becker, 1994]. Desde entonces, los ingenieros se han enfrentado al reto de diseñar, construir y operar fotobiorreactores para cultivarlas.

Hasta 1990, el tipo de fotobiorreactor más conocido y usado era el carrusel (o *raceways*) que alcanza concentraciones celulares bajas, de  $0.7gL^{-1}$  en base seca [Contreras et al., 2003]. Desde entonces, los ingenieros han diversificado ampliamente los tipos de fotobiorreactores: de placas planas, con iluminación interna, en serpentín, en columna de burbujeo o *airlift*. Frente a todo este repertorio de nuevos modelos de fotobiorreactores, surge la necesidad de evaluar sus posibilidades y rendimientos. ¿Cómo escoger entonces entre los diferentes modelos? ¿Cómo dimensionar el modelo escogido?

La elección se orientó a los reactores *airlift*, debido a que son reactores cerrados, robustos y según [Contreras et al., 2003], ellos alcanzan mayores productividades y densidades celulares de hasta  $3g/L$  en base seca que los reactores abiertos.

Ahora bien, de su diseño y operación dependen la productividad y la concentración máxima de células alcanzada, siempre y cuando en su interior se garantice la disponibilidad de nutrientes, así como condiciones de temperatura, pH, mezclado y la eliminación de productos inhibidores. En otras palabras, el fotobiorreactor puede considerarse como el corazón del proceso biotecnológico, pues en él ocurre la multiplicación y crecimiento de las microalgas.

Por estas razones, el cultivo de microalgas representa grandes retos, no solamente en el diseño del fotobiorreactor, sino también en los aspectos relacionados con su operación. En este orden de problemas cabe preguntarse: ¿Cómo evitar la fotoinhibición? ¿Cómo evitar la inhibición por oxígeno o por  $CO_2$ ? ¿Cuáles son los medios de cultivo adecuados y para cuáles cepas? ¿Duración de los fotoperíodos? ¿Cómo puede automatizarse el proceso?

Teniendo en el horizonte tan entusiasmantes desafíos planteados a la ingeniería moderna de fotobiorreactores, el presente trabajo trata al menos de enfrentarlos

parcialmente, buscando definir criterios para el dimensionamiento y evaluación de una configuración de fotobiorreactores *airlift* de tubos concéntricos. Su satisfactoria conclusión implica entonces diseñar y construir un modelo adaptado a nuestras posibilidades y requerimientos, así como evaluarlo con el cultivo de una microalga. De esta manera se pretende, además, legar a la universidad EAFIT un modelo de fotobiorreactor del que no disponía.

# Capítulo 3

## Marco teórico

### 3.1. Microalgas y *Chlorella sorokiniana*

Las microalgas constituyen un grupo de organismos unicelulares muy diverso que, gracias a su alta eficiencia fotosintética, gran plasticidad y diversidad metabólica, han colonizado una amplia variedad de ecosistemas acuáticos y terrestres. La alta diversidad que presentan no ha sido aún bien estudiada, pues de las aproximadamente 150.000 especies que se estima existen, el 90 % está aún por valorar. Se calcula que existen de 30.000 a 100.000 especies de microalgas que incluyen representantes tanto eucarióticos como procarióticos (cianobacterias o algas verdeazuladas) [BioPlat, 2010].

Ante esta gran diversidad de microalgas, nace la inquietud de aislar y evaluar aquellas cuyo crecimiento presenta interés biotecnológico. En este sentido, en el Cuadro 3.1, se hace un resumen del contenido lipídico de diferentes cepas de microalgas, por cuanto dicho contenido está estrechamente vinculado con la posibilidad de obtener lípidos para biodiesel.

Los microalgas fueron de los primeros microorganismos que evolucionaron para aprovechar la luz solar, metabolizar  $CO_2$  y producir  $O_2$ . A este amplio grupo de organismos fotoautótrofos se le atribuye la composición oxidante de la atmósfera que permitió la evolución de los seres heterótrofos. Las microalgas, aunque son organismos más primitivos tienen, con respecto a las plantas superiores, una mayor eficiencia fotosintética, lo que les permite generar cantidades de biomasa iguales en menor terreno cultivado [Chisti, 2007]. Estas características de las microalgas las hacen candidatas especiales para la captura de  $CO_2$  en fotobiorreactores.

*Chlorella*, del filo *Chlorophyta*, es un género de microalgas verdes. Su forma es esférica, sin flagelos, y mide de 2 a  $10\mu m$  de diámetro. Su reproducción es asexual. La clorofila de *Chlorella* está compuesta por clorofila-a y -b. La Figura 3.1 muestra micrografías de *Chlorella sorokiniana*.

Las microalgas presentan una alta eficiencia fotosintética, estimada por la relación entre la tasa fotosintética ( $F$ ) y la energía luminosa incidente ( $E$ ). La

Cuadro 3.1: Contenido lipídico de algunas cepas de microalgas [Chisti, 2007]

Microalga	Contenido lipídico (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25 – 75
<i>Chlorella sp.</i>	28 – 32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16 – 37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25 – 33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris sp.</i>	20 – 35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31 – 68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35 – 54
<i>Nitzshcia sp.</i>	45 – 47
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	20 – 30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50 – 77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15 – 23

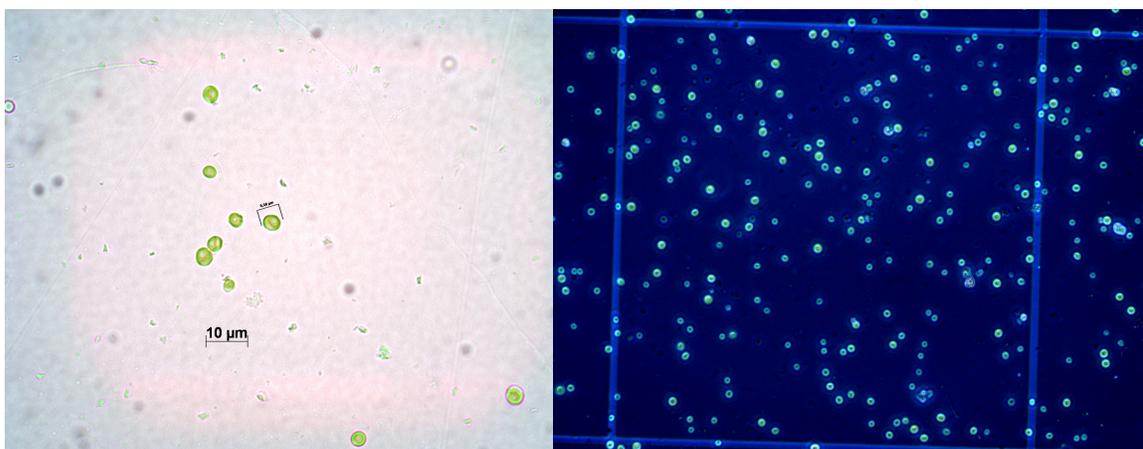


Figura 3.1: Micrografías de *Chlorella sorokiniana*

eficiencia fotosintética ( $F/E$ ) es entonces una medida de cuanta luz es capaz de utilizar un organismo con relación a la cantidad de luz total que se le suministra. Cada cepa de microalga cuenta con una constante de saturación luminosa por encima de la cual la eficiencia fotosintética disminuye hasta llegar a casos de foto-inhibición [Contreras et al., 2003], [Becker, 1994]. Por este motivo, la iluminación que se proporciona o a la que se somete el cultivo es una variable de diseño de interés.

Las microalgas, al igual que las plantas superiores, necesitan de varios elementos químicos para su completo desarrollo. Estos elementos se clasifican en macronutrientes: carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno; en nutrientes: potasio, calcio, magnesio, fósforo y azufre; y micronutrientes: cloro, hierro, boro, manganeso, zinc, cobre, níquel y molibdeno. Estas necesidades exigen la formulación de medios de cultivo completos y balanceados [H.Raven et al., 2007].

Las microalgas son igualmente sensibles a las concentraciones de gases disueltos en el medio: oxígeno, dióxido de carbono y óxidos de azufre y nitrógeno. Altas concentraciones de  $CO_2$  pueden acidificar ostensiblemente el medio, provocando una inhibición del crecimiento por  $CO_2$ . En el lado opuesto, concentraciones muy altas de oxígeno pueden provocar una inhibición por  $O_2$ . Estas situaciones de inhibición, hacen del nivel de burbujeo una variable pertinente para la incorporación o despojo de aquellos compuestos en su medio [Morit et al., 2001].

Las características de las microalgas anteriormente expuestas, revelan entonces la importancia que tienen en su crecimiento factores como: la luz, el medio de cultivo y el burbujeo. En los capítulos donde se formulan los objetivos y el diseño de experimentos se refleja el compromiso asumido en este trabajo en la evaluación de algunos de ellos.

## 3.2. Diseño de fotobiorreactores

El diseño de reactores químicos es un área en la que convergen varias ramas de la ingeniería y del conocimiento como lo muestra la Figura 3.2.

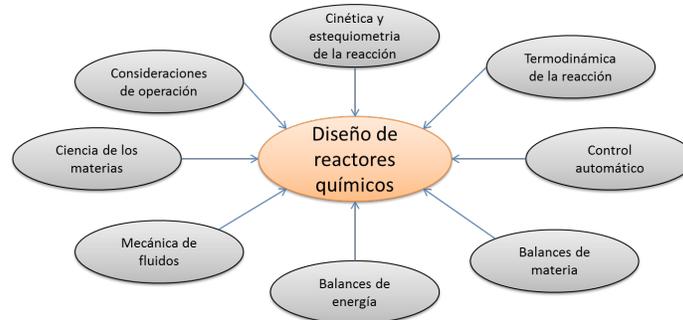


Figura 3.2: El diseño de reactores químicos, un reto multidisciplinario.

Los fotobiorreactores son una clase especial de reactores. La palabra que los denomina está compuesta por dos prefijos griegos: foto (luz) y bio (vida); con lo cual se alude al hecho de que son reactores que proporcionan o que están expuestos a la luz para hacer crecer en su interior organismos que realizan fotosíntesis.

Actualmente se conocen múltiples modelos de fotobiorreactores. La Figura 3.3 ilustra algunos de ellos:

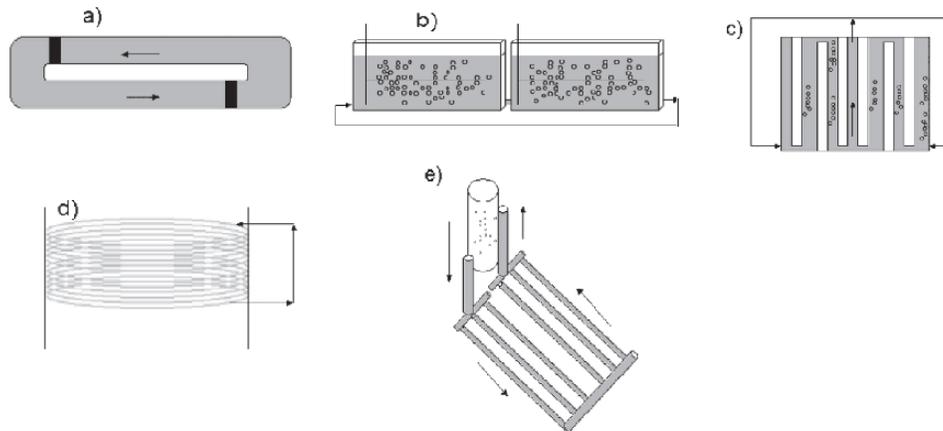


Figura 3.3: Diferentes modelos de fotobiorreactores [Contreras et al., 2003]

La Figura 3.3 a) corresponde a la vista superior de un fotobiorreactor del tipo carrusel. En este modelo, la circulación del medio de cultivo se garantiza con el movimiento lento de unas aspas (bloques negros) en un circuito cerrado. Este tipo de reactores son abiertos. La Figura 3.3 b) es el esquema de un fotobiorreactor de placas planas. La Figura 3.3 c) es un modelo de fotobiorreactor con iluminación

interna; los bloques blancos corresponden a zonas de luz. La Figura 3.3 d) es un fotobiorreactor en serpentín y la Figura 3.3 e) es un reactor con panel de circulación.

Autores como [Doran, 1998] o [Contreras et al., 2003] recomiendan las siguientes consideraciones heurísticas a la hora de diseñar un fotobiorreactor:

- La trayectoria de la luz debe ser pequeña ( $< 10cm$ )
- Mantener una alta densidad celular ( $> 8 - 15g/L$  base húmeda)
- Un mezclado vigoroso para asegurar ciclos de recirculación de alta frecuencia y garantizar la exposición lumínica frecuente de todas las células.
- Usar tramos cortos de tubería ( $20-30m$ ) para evitar inhibición del crecimiento por acumulación de  $O_2$ .
- Evitar acumulación de sustancias inhibitorias.
- Mantener temperatura y pH óptimos.
- Si el reactor es en columna de burbujeo, la altura de la columna debe ser por lo menos 2 veces mayor que su diámetro.

El diseño y análisis clásico de un reactor químico comienza con un balance de materia ligado a un balance de energía para calcular el tamaño que requiere el reactor, sus corrientes de alimentación y de salida. Sin embargo, como lo advierten algunas de las anteriores consideraciones heurísticas, el diseño de un fotobiorreactor radica principalmente en su dimensionamiento porque de éste depende la trayectoria de la luz, la velocidad de circulación del medio y el área de transferencia de masa. Dichas variables están estrechamente ligadas con las necesidades metabólicas del organismo que se desea cultivar, en el capítulo anterior se mencionaron las de las microalgas.

### 3.3. Fotobiorreactores *airlift*

Los reactores *airlift* (reactores de tiro o corriente de aire) constituyen una amplia familia de reactores de al menos dos fases: una fase líquida a través de la cual se burbujea aire. Frecuentemente cuentan con sólidos suspendidos. Muchos contienen sólidos en suspensión. [Doran, 1998], [Becker, 1994].

Los reactores *airlift* se diferencian de los de columnas de burbujeo, porque en ellos las corrientes de flujo ascendentes se separan físicamente de las descendentes. Para ello, los reactores *airlift* cuentan con varias estructuras bien definidas:

- Columna de burbujeo (*riser* o *upflow*): guía las burbujas hacia el separador de gases. En ella, el flujo es ascendente.
- Columna de flujo descendente (*downcomer* o *downflow*): sin burbujas; como su nombre lo indica, en esta parte se establece un flujo descendente debido a una mayor densidad aparente que en el *riser*.
- Separador de gases: ubicado en el extremo superior del reactor, es el lugar donde ocurre la separación de las burbujas que llegan por el *riser*, éste se une con el *downcomer*.
- Base: parte inferior del reactor, allí se unen, una vez más, el *riser* y el *downcomer*. En esta parte se introducen las burbujas por el *riser*.

El *riser*, el separador de gases, el *downcomer* y la base enmarcan de esta manera una continua corriente interna de mezclado. La Figura 3.4 nombra estas partes en un *airlift* tubular de *riser* concéntrico (a) y en otro con *downcomer* concéntrico (b).

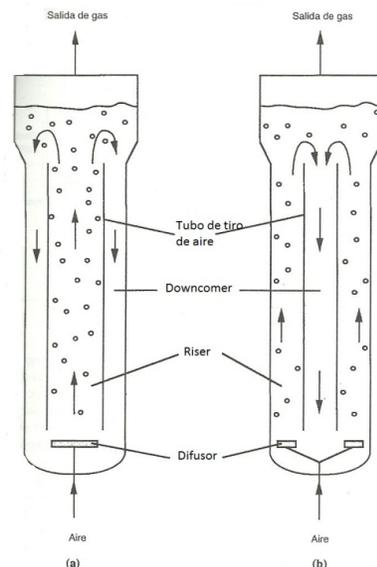


Figura 3.4: Partes características de un reactor *airlift* [Doran, 1998].

La Figura 3.5 pone en evidencia las múltiples configuraciones posibles en el diseño de reactores *airlift* e ilustra el sentido del flujo que se establece al interior de cada uno de ellos.

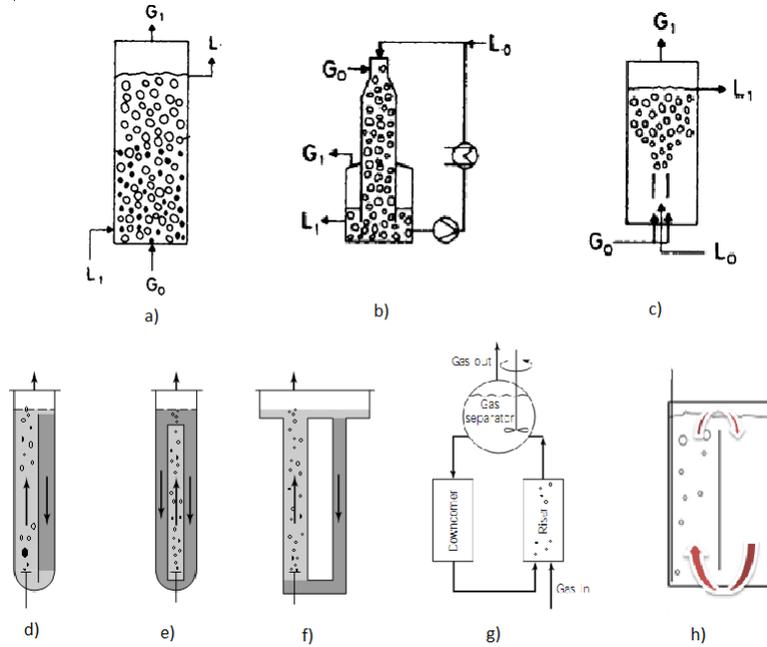


Figura 3.5: Diferentes modelos de reactores *airlift* [Contreras et al., 2003] y [Shah et al., 1982]

Las Figuras 3.5 a), b) y c) no corresponden a reactores *airlift* porque no cuentan con la geometría que separa una corriente de flujo ascendente de una descendente. La Figura 3.5 a) corresponde a una columna de burbujeo. La Figura 3.5 b) a una columna de burbujeo en contracorriente y la c) a un reactor JET.

La Figura 3.5 d) es un *airlift* cilíndrico de tubo dividido. La Figura 3.5 e) es un *airlift* en una configuración de tubos concéntricos. La Figura 3.5 f) ilustra un *airlift* de bucle externo; el *downcomer* y el *riser* son independientes. La Figura 3.5 g) es un *airlift* de bucle externo y con separador de gases agitado. La Figura 3.5 h) es un reactor *airlift* de placas planas.

### 3.3.1. Configuraciones de reactores *airlift*

Como se mencionó anteriormente, los reactores *airlift* cuentan con las siguientes partes: *riser*, *downcomer*, base, separador de gases y difusor. La elección del tipo de cada una de ellas determina la configuración del reactor. Por ejemplo, la separación que se elige entre el *riser* y el *downcomer* establece dos grandes categorías de reactores *airlift*: reactores de bucle interno (el *riser* se separa del *downcomer* por tubos o superficies sumergidas) y reactores de bucle externo (el *riser* y el *downcomer* son independientes). El Cuadro 3.2 expone las diferentes

opciones para cada estructura.

Cuadro 3.2: Posibles configuraciones de las diferentes partes de un reactor *airlift* [Merchuk and Gluz, 2010]

<i>riser</i>	Liso o con baffles. Con múltiples perforaciones Figura 3.6 I) a) o sin ellas. Con o sin agitación adicional Figura 3.6 I) b)
<i>downcomer</i>	Con a sin empaque. Con baffles o sin ellos Figura 3.6 I) f)
base	Redondeada, cónica, con agitación mecánica, con sistema de levantamiento adicional Figura 3.6 I) a)
separador de gas	Agitado a sin agitar. Ver Figura 3.6 II)
difusor	Difusor poroso, difusor de orificio, difusor de boquillas, difusor agitados, difusor eyector-inyector

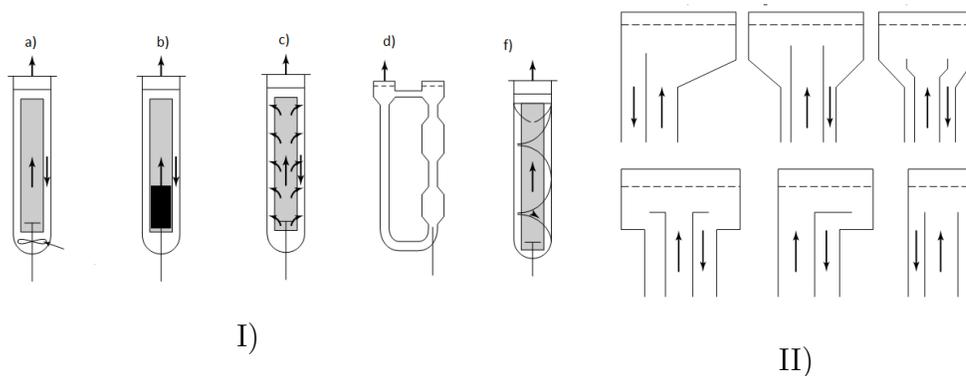


Figura 3.6: Configuraciones especiales de reactores *airlift* [Merchuk and Gluz, 2010]

### 3.3.2. Ventajas y desventajas de los reactores *airlift*

Las ventajas de los reactores *airlift* son numerosas:

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

El bajo consumo energético, la facilidad de construcción y de escalamiento han hecho que estos reactores sean extensamente usados para tratamientos de agua

residuales, fermentaciones aerobias y propagación de células animales y vegetales. A igualdad de aire burbujeado y de sección transversal, los reactores *airlift* presentan, frente a las columnas de burbujeo, mayores velocidades superficiales de líquido logrando mejores mezclados con poco flujo de aire [Martín, 2001].

Por otro lado, los reactores *airlift* no son recomendables cuando el medio de cultivo es muy viscoso o contiene partículas sólidas muy densas. Dependiendo de la construcción y de los accesorios, estos reactores pueden o no esterilizarse [Lizardi, 2011].

Por las anteriores ventajas y pocos inconvenientes, este trabajo consideró más provechoso ahondar en el diseño y montaje de una configuración de fotobiorreactor *airlift*. La configuración en tubos concéntricos minimiza además los puntos de pega ofreciendo una geometría con pocos puntos muertos, fácil mantenimiento y geometría robusta .

# Capítulo 4

## Objetivos

### 4.1. Objetivo general

- Evaluar un prototipo de fotobiorreactor *airlift* con la productividad y máxima concentración celular alcanzadas en el cultivo de la microalga *Chlorella sorokiniana* .

### 4.2. Objetivos específicos

- Diseñar un prototipo de fotobiorreactor *airlift* a partir de las heurísticas y modelos matemáticos reportados en la literatura.
- Construir el prototipo diseñado atendiendo sus necesidades de aportes de luz, servicios, automatización, selección de materiales y mantenimiento.
- Evaluar el crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en el prototipo de reactor construido en dos medios de cultivo diferentes: medio de cultivo Bristol y un medio de cultivo a base de fertilizante triple 18.
- Evaluar el crecimiento de la misma cepa en intensidades y colores de luz diferentes.
- Evaluar el crecimiento y el comportamiento del reactor a dos niveles de burbujeo diferentes.
- Comparar las cinéticas obtenidas con valores reportados en la literatura para otros reactores *airlift*.

# Capítulo 5

## Diseño y montaje de una configuración de fotobiorreactor *airlift*

### 5.1. Ecuaciones de diseño

#### 5.1.1. Variables de diseño

Para diseñar y dimensionar fotobiorreactores *airlift* deben considerarse las siguientes variables [Merchuk and Gluz, 2010] [Doran, 1998]:

- Volumen del reactor.
- Factor de forma: es la relación entre la base y la altura del reactor. En reactores cilíndricos, se calcula como la relación entre la altura y el diámetro en de la base  $h/D_b$ .
- Relación entre el área del *riser* y del *downcomer*,  $A_r/A_d$ .
- Geometría del separador de gases y de la base
- Tipo de inyector de aire.
- Densidad lumínica volumétrica
- Densidad lumínica por área expuesta.

#### 5.1.2. Variables de operación

Una vez construidos los fotobiorreactores, el correcto funcionamiento y desempeño de estos depende de las siguientes variables de operación:

- Relación volumétrica o de masa del gas burbujeado con respecto a la cantidad de medio.
- Nivel del líquido por encima del *riser*.

- Duración de los fotoperíodos.
- Intensidad lumínica suministrada.

### 5.1.3. Variables de respuesta

Las siguientes variables preocupan y determinan en gran medida el diseño y la operación de fotobiorreactores *airlift*:

- Tiempo de contacto entre la burbuja y el medio de cultivo.
- Tránsito de masa.
- Velocidad de circulación del medio.
- Tiempo de reciclo.
- Disponibilidad de nutrientes.
- Disponibilidad lumínica.

### 5.1.4. Relaciones de diseño y ecuaciones

Autores como [Sánchez et al., 2004] y [Lizardi, 2011] evaluaron la fluidomecánica de reactores *airlift* y columnas de burbujeo con técnicas de trazadores. Con trazadores como ácidos, bases, electrolitos o colorantes evaluaron y las respectivas sondas determinaron la velocidad superficial del líquido o el tiempo de mezclado de diferentes configuraciones de reactores.

El Cuadro 5.1 de [Lizardi, 2011] es un resumen de las relaciones geométricas escogidas por diferentes autores como las mejores relaciones para reactores *airlift* de tubos concéntricos.  $L_t/L_r$  es la relación en la altura del líquido y la altura de la columna de burbujeo.  $A_d/D_r$  es la relación entre el área del *downcomer* y la del *riser*.

Cuadro 5.1: Relaciones geométricas de reactores *airlift* de tubos concéntricos escogidas por diferentes autores [Lizardi, 2011]

Referencia	$L_t/L_r$	$A_d/A_r$	Fase líquida
Quintero, 1990	0.6-0.9	0.9290	Agua
Chisti y Jáuregui-Haza, 2002	0.83	1.2956	Célulosa/agua
Sánchez-Mirón y col.,2004	0.81	0.8261	Agua
Cheng-Shing y Shyh-Jye2004	0.78	1.2956	Tolueno/agua
Mehrnia y col., 2005	0.9	1.2276	Derivados del petróleo/agua
Shariati y col., 2007	0.74	0.9837	Derivados del petróleo/agua
Cerri y col., 2010a	0.80	1.6874	Glicerol/agua Xantano/agua
Luo y Al-Dahhan, 2011	0.70	1.1626	Agua

[Merchuk and Gluz, 2010] propone una gran cantidad de ecuaciones emperícas para determinar el levantamiento de reactores *airlift* de bucle internos y de esta manera su fluidomecanica. Un par de ellas son las (5.3) y (5.4).

$$\Delta P = \rho_L g (\varphi_r - \varphi_d)$$

$$J_{Gr} = \frac{Q_{in} + Q_d}{A_r}$$

$$\varphi_r = 0,441 J_{Gr}^{0,841} \mu_{ap}^{-0,135}$$

$$\varphi_d = 0,297 J_{Gr}^{0,935} \mu_{ap}^{-0,107}$$

La diferencia de presión entre el *riser* y el *downcomer* ( $\Delta P$ ) está dada por la densidad del líquido  $\rho_L$ , la gravedad  $g$  y la diferencia en el levantamiento entre las dos secciones ( $\varphi_r - \varphi_d$ ). El levantamiento depende a su vez de la velocidad  $J_{Gr}$  en el *riser*.  $Q_{in} + Q_d$  son los caudales de área burbujeado y recirculado.

### 5.1.5. Medidas y relaciones del modelo construido

Cuadro 5.2: Dimensiones y relaciones del modelo de *airlift* construido.

<b>Dimensiones del reactor</b>	
Altura del cilindro (cm)	51,0
Altura de la columna de burbujeo (cm)	40,0
Diámetro del reactor (cm)	17,0
Diámetro de la columna de burbujeo (cm)	6,0
área columna de burbujeo ( $cm^2$ )	28,3
área anillo <i>downcomer</i> ( $cm^2$ )	198,7
<b>Relaciones del reactor</b>	
Relación altura/diámetro	3,0
Relación de área <i>downcomer/riser</i>	7,0
<b>Capacidad del reactor</b>	
Altura nivel del cultivo (cm)	39,8
Volumen total ( $cm^3$ )	11575,9
Volumen nominal ( $cm^3$ )	9040,0

A continuación se presentan los planos del modelo construido. Los espejos del fondo permiten la reflexión de luz y su mayor aprovechamiento. La luminaria y la soplante se escogieron dentro del repertorio de artículos para pecera. La Figura 5.2 son imágenes de los prototipos construidos: la de la izquierda corresponde a un prototipo inicial cuya válvula se estropeó en poco tiempo y la imagen de la derecha a los prototipos finales establecidos en el plano hechos en Autocad 2009®

de la Figura 5.1.

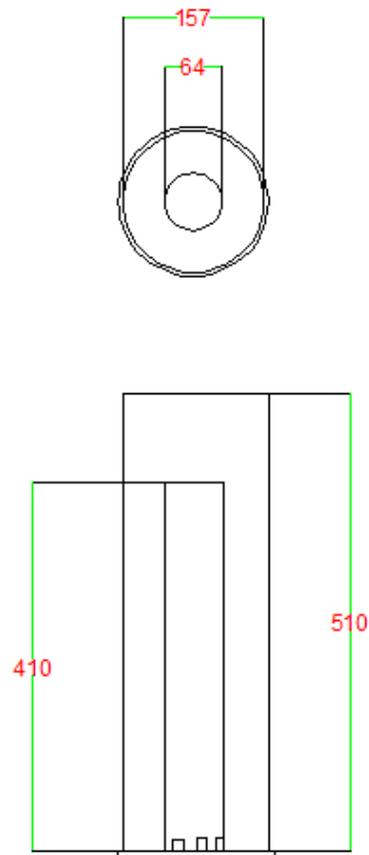


Figura 5.1: Planos del modelo construido



Figura 5.2: Prototipos construidos y funcionando.

## 5.2. Materiales de construcción

Los avances en ingeniería de los materiales y ciencia de los materiales han multiplicado las opciones a la hora de escoger un material para cumplir con las especificaciones que requiere una aplicación. Existen diferentes metodologías para la selección de un material (desde gráficas hasta bases de datos) pero todas estas parten de una hoja de especificación que responde a muchas de las siguientes preguntas:

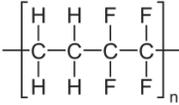
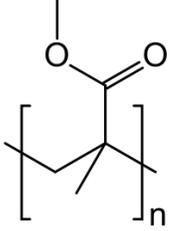
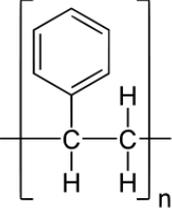
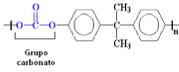
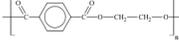
- ¿A qué condiciones de temperatura estará sometido el material?
- ¿El material tendrá contacto con sustancias corrosivas o con las que pueda reaccionar?
- ¿El material debe ser impermeable y resistente al agua?
- ¿A qué tipo de solicitaciones (compresión, tracción, flexión) estará sometido el material y en qué magnitud?

En la construcción de fotorreactores prima la pregunta sobre las calidades ópticas del material de construcción. En efecto, a menos que la fuente de luz sea interna al reactor (lo que conlleva otros importantes retos de fabricación) el material de un fotorreactor debe filtrar o dejar pasar los rayos de luz. El material debe ser entonces transparente o translúcido. Con esta especificación, se puede prescindir de los materiales opacos. Los materiales metálicos no pueden cumplir con las especificaciones, estrechando la búsqueda en los cerámicos y polímeros.

Los vidrios (que son materiales cerámicos) y los polímeros, ofrecen amplia variedad de materiales que presentan transparencia. Además de esta calidad, el material para la construcción de un fotobiorreactor para el cultivo de microalgas debe presentar las siguientes calidades:

- Resistencia e impermeabilidad al agua y medios de cultivo salinos.
- Inerte a productos de limpieza como soluciones de ácido clorhídrico o hipoclorito de sodio.
- Resistencia a fuerzas en compresión y tracción debidas a las presiones por la columna de agua contenida en su interior.
- Superficie lisa para su fácil limpieza y para evitar la incrustación de microorganismos en ranuras y poros.
- Resistir a condiciones de temperatura de 17 a 60°C.
- Fotoestabilidad (la luz solar y la radiación UV no deben amarillentar el material, alterando sus cualidades ópticas)
- Bajo costo y disponibilidad en el mercado colombiano.

Cuadro 5.3: Materiales transparentes y sus características

Nombre	Características	Usos	Molécula
etileno-tetrafluoretileno (ETFE)	transmisión de la luz del 95 %, resistencia rayos ultravioleta, al calor, química y mecánica,	Páneles para construcción arquitectónicas.	
polimetilmetacrilato (PMMA)	Transparencia del 93 %, alta resistencia al impacto, dureza similar al del aluminio, bajo peso (1 190 kg/m <sup>3</sup> )	Cristales para gafas, lupas, duchas, vajillas, paneles luminosos, peceras, tapas	
poliestireno (PS)	El poliestireno cristal es un polímero duro y quebradizo.	Cajas de chocolates, desodorantes	
policarbonato (PC)	Los policarbonatos son un grupo de termoplasticos ampliamente utilizados.	CDs, faros de autos, tapas luminarias, mirillas	
polietileno tereftalato (PET).	Liviano, resistente a ácidos, muy buena barrera de CO <sub>2</sub> .	Envases de bebidas y aceites.	
vidrio	Muy estable pero pesado (2,2 g/cm <sup>3</sup> )	Envases, ventanas, instrumentos de laboratorio	

El Cuadro 5.3 hace una lista de materiales transparentes bien conocidos en la industria.

La transparencia es una característica que depende de la estructura molecular del material. Contrariamente a lo que se puede pensar, los materiales amorfos y no cristalinos son los que presentan mayor transparencia. El vidrio es de hecho un material amorfo considerado como un líquido subenfriado. Para que los polímeros conserven la característica de transparencia deben enfriarse rápidamente para no dar tiempo a las moléculas de acomodarse de manera organizada.

El PMMA fue seleccionado para el montaje de los fotobiorreactores *airlift* porque este material se destaca por su resistencia a la intemperie, transparencia y resistencia al rayado. Este metacrilato es de fácil termoformado. Sin embargo puede amarillentarse tras exposiciones prologadas a rayos UV. Otros compuestos como acetato de etilo, acetona, ácido acético, ácido sulfúrico, alcohol amílico, bencol, butanol, diclorometano, triclorometano (cloroformo), tolueno pueden opacarlo. Aunque este material no es producido en Colombia se importa del Brasil y varios talleres se dedican a su maquinado, es el caso de *Exquisit® todo en acrílicos* en Envigado.

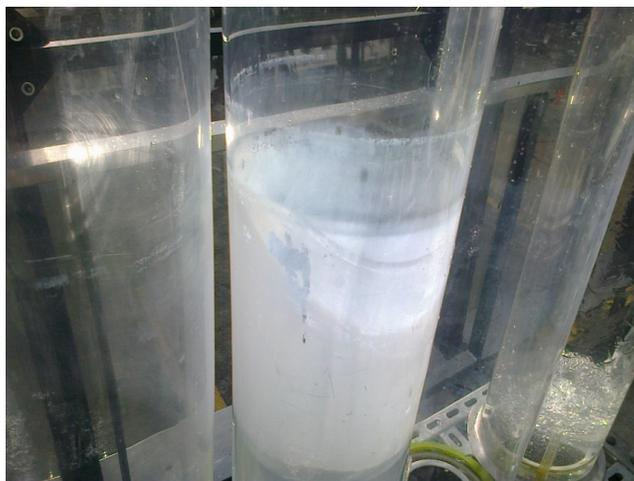


Figura 5.3: Cilindro en polimetilmetacrilato opacados por la luz UV y compuestos químicos.

## 5.3. Automatización

Las variables que deben medirse y controlarse en los procesos industriales son cada día más numerosas. Del buen control de estas variables depende el desempeño de los procesos. En el ámbito de la experimentación, los avances en el diseño estadístico de experimentos exigen el bloqueo de ciertos factores y la variación precisa y deliberada de aquellos que se desean estudiar. Bajo este contexto, el control automático de las unidades experimentales y de los procesos industriales dejó de ser una comodidad y un lujo para convertirse en una imperativa necesidad. El presente trabajo buscó entre las alternativas de control automático para implementar una en el montaje de los fotobiorreactores *airlift*.

La gran variedad de tecnologías hace que sea difícil seleccionar un PLC o sistema de control. Sin embargo, su selección puede basarse en las siguientes preguntas:

- ¿Cuántos actuadores y sensores tiene el sistema de control y de qué tipo son?
- ¿El algoritmo de control necesita la comparación de valores analógicos o solo binarios? ¿Cuál es su complejidad?
- ¿Es necesario el monitoreo del sistema a distancia o visualizar algunas variables en tiempo real?
- ¿Es necesario el almacenamiento de valores históricos para su posterior análisis?

La respuesta a muchas de las anteriores preguntas determinará el número de entradas y salidas que debe tener el sistema de control, los módulos de entradas acondicionadas, los variadores y la posibilidad de conectarse a una pantalla o a una HMI (human machine interface). Entre más prestaciones tenga el sistema de control más costoso será éste.

### 5.3.1. Autómatas programables (PLC)

Para la automatización de los fotobiorreactores, se buscó una alternativa entre los pequeños autómatas programables, conocidos bajo las siglas de micro-PLC. Estos dispositivos son una de las mejores opciones por su robustez, precisión, seguridad, posibilidades de expansión y facilidad de programación. Existe un buen número de fabricantes que comercializan diferentes modelos. Siemens® , Mitsubishi® , Allen Bradley® , General Electric® son algunas de las marcas de PLC más difundidas en Colombia. La Figura 5.4 muestra varios modelos de micro-PLC o relés programables.

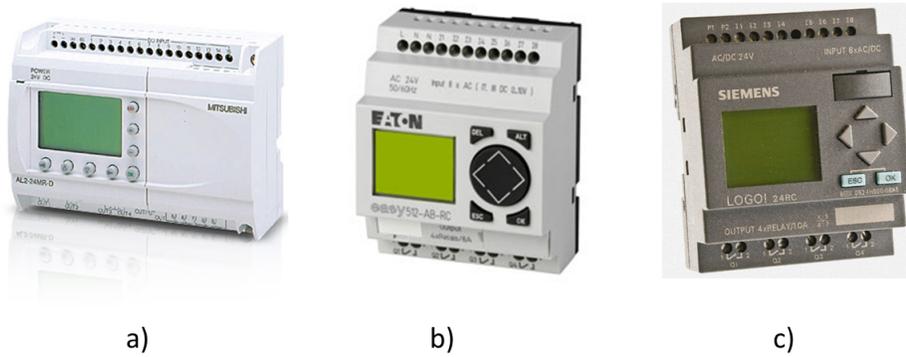
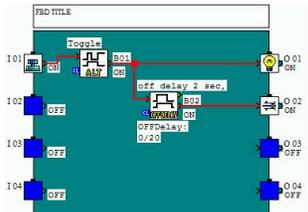


Figura 5.4: Diferentes modelos de micro-PLC.

a) micro-PLC de la serie alpha de Mitsubishi®, b) micro-PLC EATON® serie easy-500, c) micro-PLC serie Logo de Siemens®.

Se optó entonces, en este trabajo, por cablear un AL2-14MR-D™ de Mitsubishi® para temporizar los fotoperíodos y el burbujeo. Este PLC cuenta con 8 entradas y 6 salidas en relé. Tiene la posibilidad de recibir un módulo de expansión de 4 salidas en transistores o 2 entradas de PT100 o termocuplas. Este dispositivo cuenta con un calendario y un reloj de tiempo real lo que ofrece amplias posibilidades en protocolos de temporización.

Cuadro 5.4: Programación de los micro-PLC de la serie alpha de Mitsubishi

Micro-PLC de la serie alpha de Mitsubishi®	Programación gráfica en bloques de funciones	SW0D5-ALVLS-EU Alpha programming
		

# Capítulo 6

## Evaluación de la configuración de fotobiorreactor construida

### 6.1. Diseño de experimento

Con un diseño de experimento en bloques completos al azar [Gutiérrez and Vara, 2008], se evaluó la configuración de los *airlift* construidos en 3 niveles de luz y en dos medios de cultivo. Los mejores tratamientos obtenidos de este primer experimento se llevaron a un diseño unifactorial para evaluar dos niveles de burbujeo.

Cuadro 6.1: Variables del primer experimento en bloques completos al azar para evaluar

Factor de estudio	Intensidad y color de luz: 40W de luz blanca; 20W de luz blanca; 20w de luz rosada + 20W de luz azul
Bloques	Medios de cultivo: Medio Bristol; medio con fertilizante triple 18
Factores bloqueados	Configuración del reactor; 8h de luz 14 de oscuridad; 53L de aire cada h.
Variables de respuesta	Densidad celular máxima alcanzada; productividad, tiempo de cultivo.

Cuadro 6.2: Variables del segundo experimento unifactorial para evaluar nivel de burbujeo

Factor de estudio	Intensidad de burbujeo: 53L/h; 90L/h
Factores bloqueados	Configuración del reactor; 8h de luz 14 de oscuridad; medio con fertilizante triples 18; 40W luz blanca y colores
Variables de respuesta	Densidad celular máxima alcanzada; productividad, tiempo de cultivo.



Figura 6.1: Iluminación de los reactores *airlift*

De izquierda a derecha: 40W de luz blanca, 20W de luz blanca y 20W de luz rosa + 20W de luz azul.

Cuadro 6.3: Medios de cultivo utilizando en las cinéticas del primer experimento

Medio Bristol	Medio con fertilizante triple 18
$NaNO_3$ , $NaNO_3$ , $CaCl_2$ , $MgSO_4$ , $K_2HPO_4$ , $NaCl$ , $KH_2PO_4$ y trazas metálicas	Un gramo de triple 18 por litro y suplemento de hierro: 3.5% de nitrógeno amoniacal, 14.5% de nitrógeno uréico, 18% $P_2O_5$ , 18% $K_2O$ , 1% $MgO$ , 2% $S$ , trazas de hierro



Figura 6.2: Toma de muestra en la parte superior de la columna de burbujeo

## 6.2. Curvas de calibración

En química analítica, una curva de calibración es la relación gráfica que se construye entre una variable de interés (por lo general, la concentración de un analito en una solución) y otra variable que se relacione de algún modo con ésta. Si la curva construida presenta una clara tendencia, se está en capacidad de inferir el valor de una variable conociendo el de la otra. Es como en el mito griego donde Perseo no puede mirar a Medusa directamente a los ojos y tiene que saber de ella a través de un pálido reflejo en su escudo.

De los muchos métodos en química instrumental (potencial hidrógeno, potencial eléctrico, densimetría, polarimetría, refractometría, turbidimetría, densidad óptica), el presente trabajo buscó relacionar el peso seco de biomasa y la densidad celular del cultivo con su densidad óptica, para hacerle un seguimiento cinético.

El razonamiento es el siguiente: a medida que la población de microalgas crece en el interior del reactor, el número de células aumenta, por ende, aumenta la densidad celular y el peso seco de biomasa que éstas representan. El color se hace también más intenso.

### 6.2.1. Metodología para la construcción de las curvas de calibración

De una solución madre de medio de cultivo maduro de *Chlorella sorokiniana*, se sacaron diferentes alícuotas con el fin de preparar nueve diluciones a diferentes concentraciones, aforando con medio de cultivo nuevo en balones volumétricos. A estas nueve diluciones, se les midió por separado la densidad celular en cámara de Neubauer, el peso seco en balanzas de humedad y la densidad óptica en un colorímetro. Posteriormente se procedió a relacionar la densidad óptica con las dos otras magnitudes. El inconveniente de medir por separados las tres magnitudes es introducir error aleatorio en los dos ejes, pero de esta manera, se asegura que existe una relación entre las variables y la forma de medirlas.

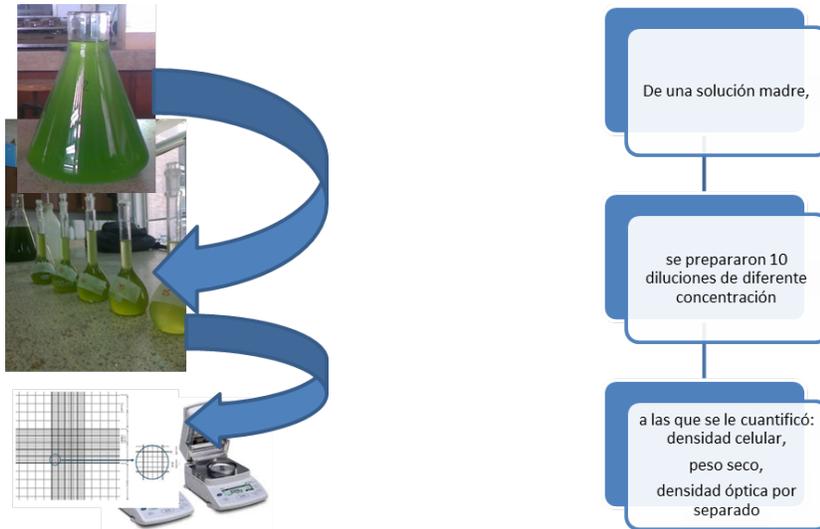


Figura 6.3: Procedimiento para la construcción de la curvas de calibración

### 6.2.2. Conteo de células en cámara de Neubauer

Se usó una cámara de Neubauer, un microscopio con cámara y un *software* de manejo de imágenes para registrar la densidad celular. Como las células de *Chlorella sorokiniana* miden un poco menos de  $4.11\mu m$ , se utilizaron los cuadros divididos en 16 cuadros de  $0.0025mm^2$  de área. Se le tomó una micrografía a 32 cuadros (16 en un cuadro lateral y los otros 16 en el cuadro del centro) para luego contar las células en un programa gráfico y evitar de esta manera los errores de conteo debidos al cansancio visual. El conteo de células difirió rara vez en más de diez células por cuadro de lo cual se deduce la homogeneidad de la muestra.

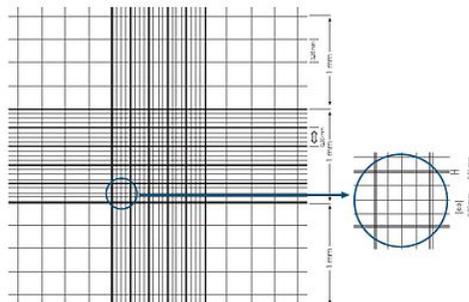


Figura 6.4: Cámara de Neubauer

El número de células por microlitro de medio de cultivo se calculó con la siguiente formula:

$$\frac{\text{células}}{\mu L} = \frac{\text{número de células contadas}}{\text{área inspeccionada}} * \text{profundidad de la cámara}$$

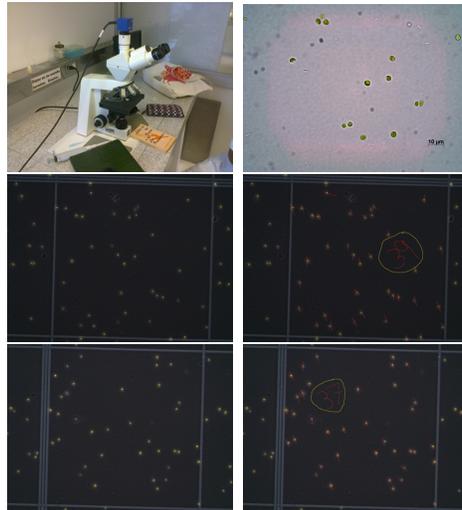


Figura 6.5: Microscopio con cámara para micrografías y conteo de células.

### 6.2.3. Peso seco de biomásas en balanzas de humedad

Las balanzas de humedad son balanzas analíticas a las que se les adiciona un sistema de secado. La metodología para determinar el peso seco de biomasa algal consistió en filtrar  $10mL$  de la solución a través de un filtro de  $0,45$  micras. Haciendo la diferencia entre el peso seco del filtro con biomasa y el peso seco del filtro limpio se estima el peso seco de biomasa de los  $10mL$ . El procedimiento se repite por duplicado para cada una de las diluciones.



Figura 6.6: Balanzas de humedad y y filtros.

### 6.2.4. Densidad óptica en espectrofotómetro

La ley de Beer-Lambert ( $A = abc$ ) ha servido en química analítica para relacionar la concentración de analito coloreado en solución con su absorbancia. Por consiguiente, a un cultivo maduro de la microalga *Chlorella sorokiniana*, se procedió a realizarle un barrido espectral desde los  $400$  hasta los  $700nm$ , como se puede ver en la Figura 6.7.

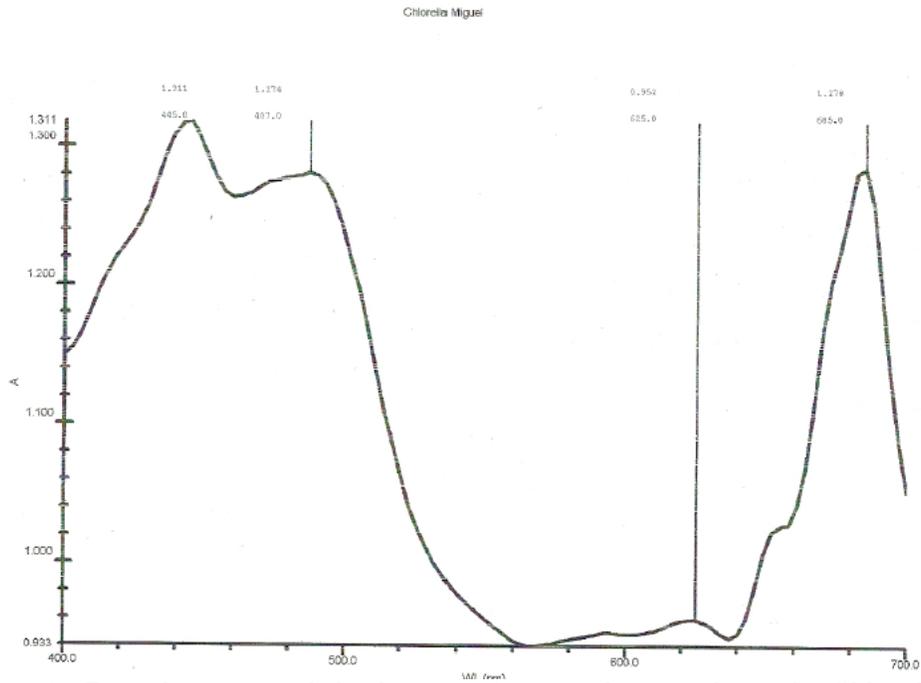


Figura 6.7: Barrido espectral desde 300 a 700nm de un cultivo de *Chlorella sorokinina*.

El barrido espectral muestra claramente dos zonas de mucha absorbancia: una alrededor de los 445nm y la otra en los 684nm. Siendo el pico en 684nm más pronunciado, se decidió trabajar con esa longitud de onda que corresponde a la absorción de la clorofila-a. El blanco se configuró con agua destilada.

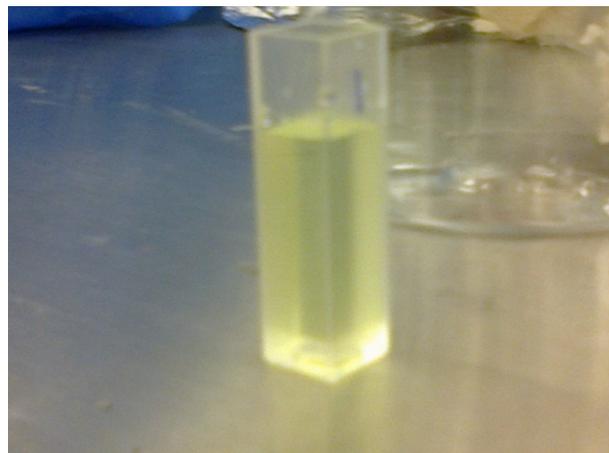


Figura 6.8: Colorimetro y celda

### 6.2.5. Curvas de calibración escogidas

La densidad óptica se convierte entonces en una medida indirecta de la densidad celular y el peso seco de biomasa. Así, se evita la pesadilla ocular de contar diariamente células en cámara de Neubauer. Además la densidad óptica es una

Cuadro 6.4: Datos curvas de calibración

Dilución	Absorbancia	Peso seco (g)	Peso seco (g/mL)	número de células	células/ $\mu L$
madre	0.887	0.0029	0.00029	4134	5.17E+05
2	0.757	0.0011	0.00011	3240	4.05E+05
3	0.599	0.0008	8E-05	2590	3.24E+05
5	0.442	0.0013	0.00013	1904	2.38E+05
6	0.263	-0.0002	-2E-05	1102	1.38E+05
7	0.167	0.00125	0.000125	930	1.16E+05
8	0.109	0.0014	0.00014	634	7.93E+04
9	0.051	0.001	0.0001	240	3.00E+04
10	0.020	-0.00075	-7.5E-05	120	1.50E+04

variable fácil y rápida de medir, presenta pocas posibilidades de error y la universidad EAFIT pone a disposición de sus estudiantes de pregrado varios equipos para tales fines. En el Cuadro 6.4, se encuentran los valores obtenidos para las tres mediciones.

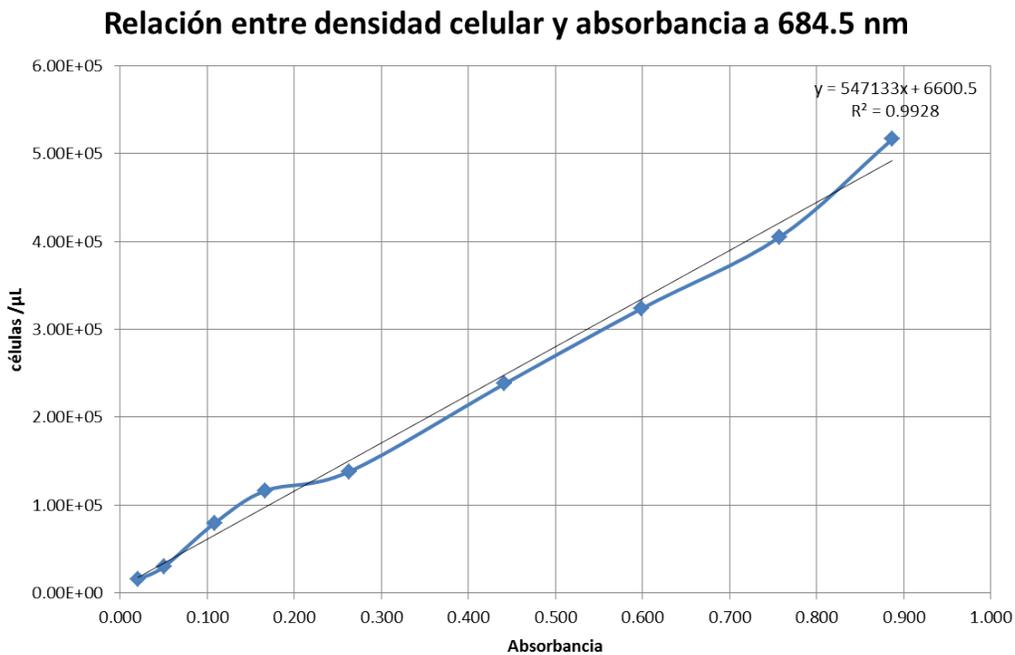


Figura 6.9: Curva de calibración que relaciona la densidad celular con la densidad óptica.

### Relación entre peso seco de biomasa y absorbancia a 684.5 nm

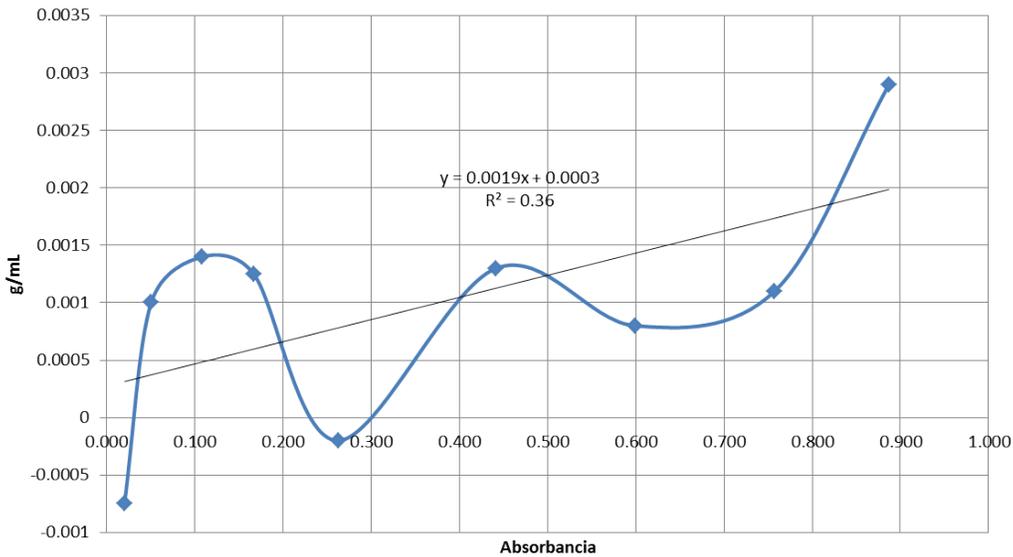


Figura 6.10: Curva de calibración que relaciona el peso seco de biomasa con la densidad óptica.

La curva de calibración de densidad celular contra absorbancia (Figura 6.9) presenta una buena bondad de ajuste. La curva de peso seco versus absorbancia (Figura 6.10) deja mucho que desear, pues no presenta una tendencia. Surgen varias hipótesis frente al fracaso de este método en balanzas de humedad: las cantidades a cuantificar son muy pequeñas, maltrato del papel de filtro al filtrar, evaporación de componentes volátiles y degradación química durante el secado.

Un gran defecto que parecen tener las anteriores curvas es que no pasan por el origen. Se podría pensar de antemano que una absorbancia nula es sinónimo de ausencia de células y peso seco. Sin embargo, esta diferencia en la absorbancia puede explicarse por el hecho de que el blanco se configura con agua destilada y no con medio de cultivo virgen. Pero durante las medidas el blanco se configuró igualmente con agua destilada con lo que no se induce a error en la toma de muestra. No sobra mencionar que las anteriores ecuaciones y curvas de calibración son únicamente válidas para el trabajo con la cepa de microalga *Chlorella sorokiniana*. El trabajo con diferentes cepas de microalgas exige la construcción de curvas de calibración para cada cepa.

### 6.3. Cinéticas de crecimiento

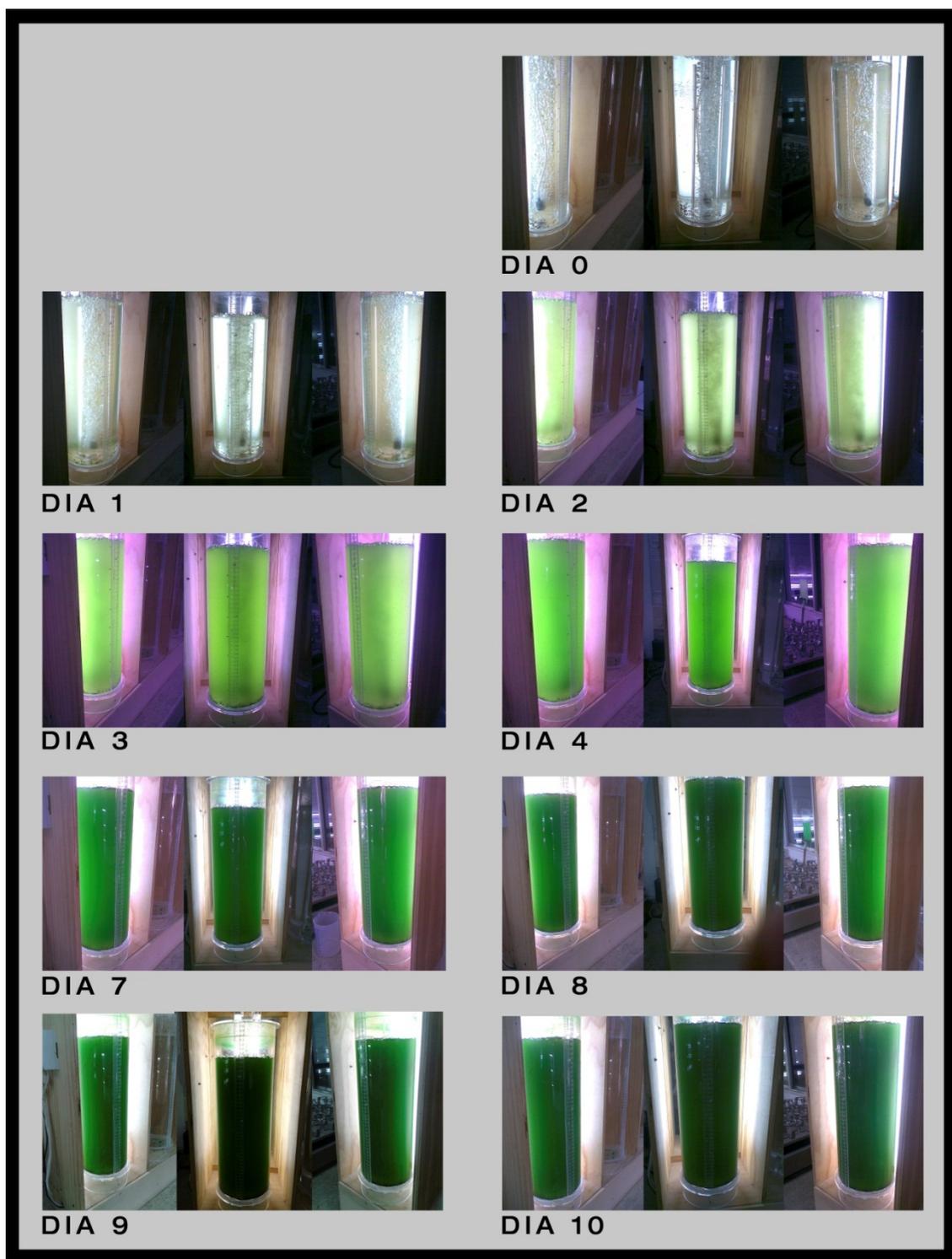


Figura 6.11: Estudio fotográfico de una cinética de crecimiento

Al ser el medio de cultivo un parámetro de operación y no una variable de diseño del reactor, se comparó como un bloque y no como un factor en un diseño de experimento en bloques al azar. Se evaluaron entonces 3 niveles de luz (20W luz blanca, 40W luz blanca y 20W luz rosada más 20W luz azul) con una réplica en dos medio de cultivo: medio con fertilizante y medio Bristol. El burbujeo se mantuvo en 53L/h y el período de luz en 8 horas de luz versus 14 de oscuridad. Las cinéticas de este primer experimento fueron las siguientes:

### 6.3.1. Medio con fertilizante

#### 1. Cinéticas de crecimiento en medio con fertilizante para 3 luces diferentes

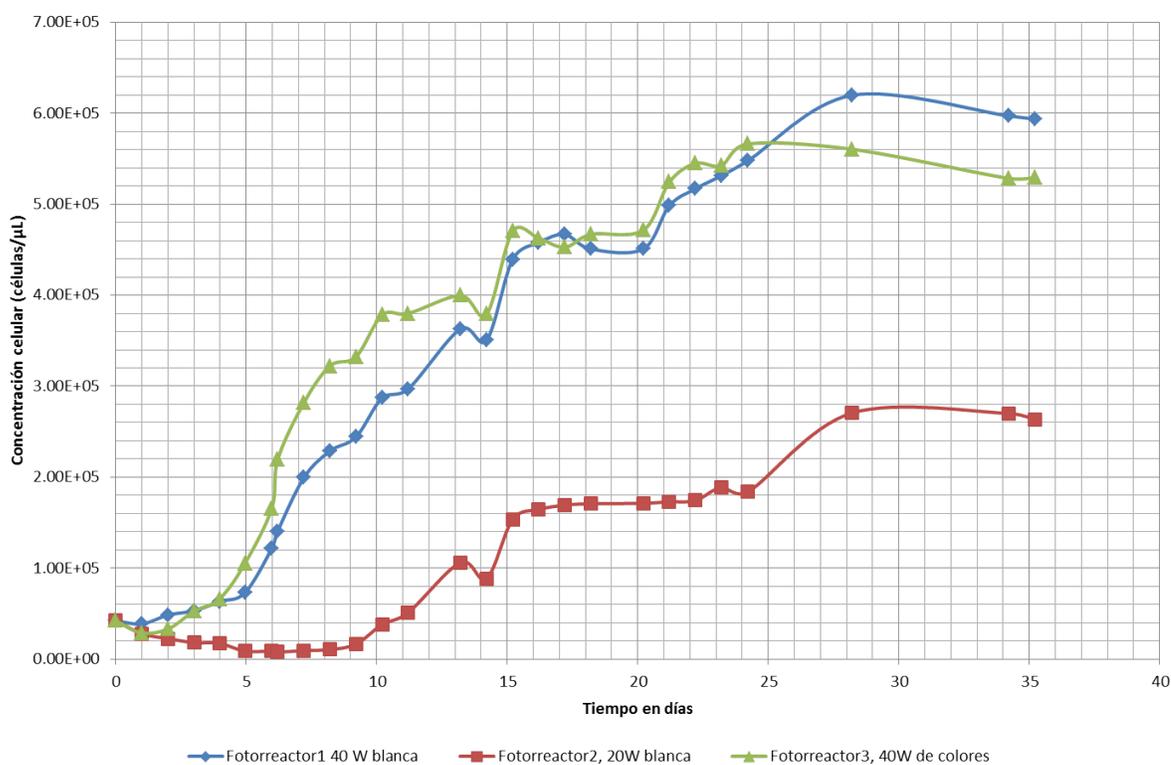


Figura 6.12: Cinéticas de crecimiento en medio con fertilizante a tres niveles de luz diferentes

## 2. Cinéticas de crecimiento en medio con fertilizante para 3 luces diferentes

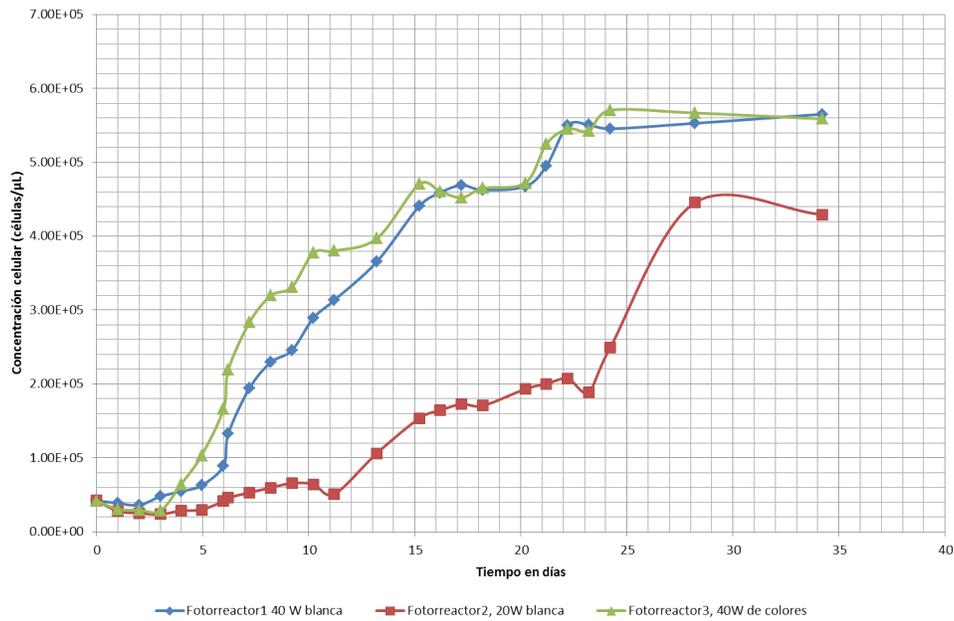


Figura 6.13: Réplica cinéticas de crecimiento en medio con fertilizante a tres niveles de luz diferentes

### 6.3.2. Medio Bristol

#### 1. Cinéticas de crecimiento en medio Bristol para 3 luces diferentes

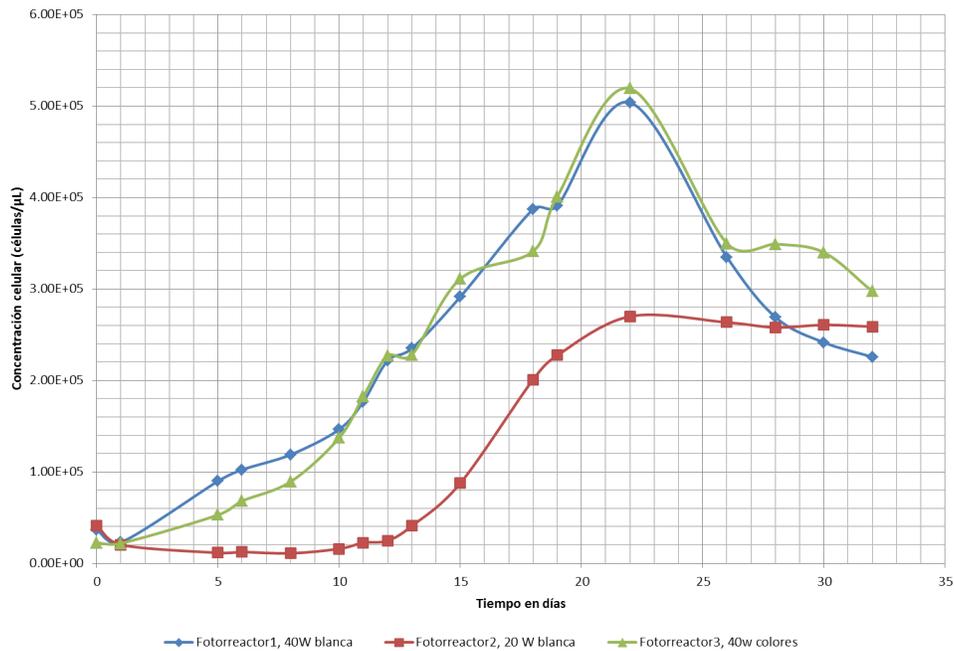


Figura 6.14: Cinéticas de crecimiento en medio Bristol a tres niveles de luz diferentes.

## 2. Cinéticas de crecimiento en medio Bristol para 3 luces diferentes

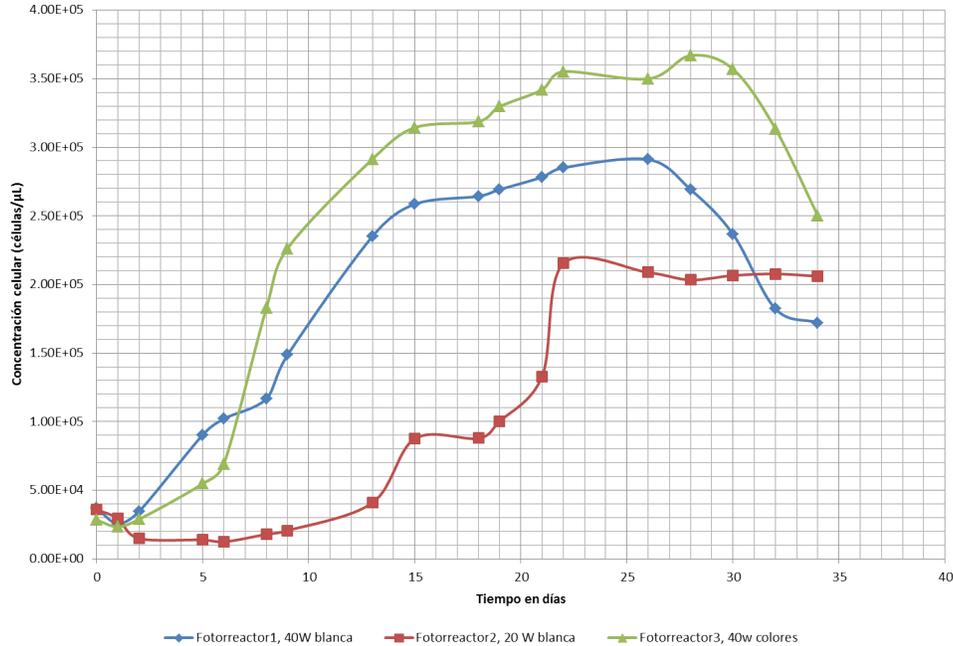


Figura 6.15: Réplica cinéticas de crecimiento en medio Bristol a tres niveles de luz diferentes.

Cuadro 6.5: Densidad celular máxima alcanzada para diferentes niveles de luz

	Densidad celular máxima alcanzada (células/ $\mu\text{L}$ )					
	Medio Bristol			Medio con fertilizante		
	Cinética 1	Cinética 2	Promedio	Cinética 1	Cinética 2	Promedio
20W luz blanca	2.71E+05	2.15E+05	2.43E+05	2.71E+05	4.45E+05	3.58E+05
40W luz blanca	5.04E+05	2.91E+05	3.98E+05	6.20E+05	5.65E+05	5.93E+05
40W luz de colores	5.19E+05	3.67E+05	4.43E+05	5.66E+05	5.70E+05	5.68E+05

### Analysis of Variance for concentracion celular - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:luz	8.49902E10	2	4.24951E10	7.82	0.0131
B:BLOCK	7.67768E10	1	7.67768E10	14.13	0.0056
RESIDUAL	4.34818E10	8	5.43523E9		
TOTAL (CORRECTED)	2.05249E11	11			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

### Multiple Range Tests for concentracion\_celular by luz

Method: 95.0 percent LSD

luz	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
20W blanca	4	322331.	36862.0	X
40W blanca	4	495053.	36862.0	X
40W colores	4	506143.	36862.0	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
20W blanca - 40W blanca	*	-172722.	120214.
20W blanca - 40W colores	*	-183812.	120214.
40W blanca - 40W colores		-11089.7	120214.

\* denotes a statistically significant difference.

Cuadro 6.6: Tabla ANOVA y test de rangos múltiples para dos niveles de luz

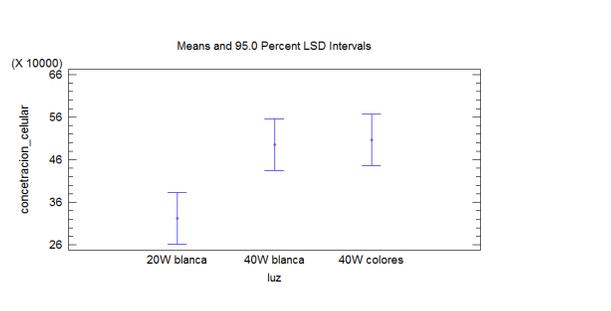


Figura 6.16: Comparación de rangos LSD, luz

De las anteriores cinéticas, se pudo observar un mejor crecimiento en los tratamientos con 40W que en los de 20W. En medio con fertilizante se obtienen concentración celulares máximas superiores a las del medio Bristol y el medio con fertilizante presenta una fase estacionaria muy prolongada frente al rápido agotamiento del medio Bristol. Por las anteriores razones, se decidió llevar los tratamientos de 40W en medio con fertilizante a un diseño unifactorial para evaluar un nivel de burbujeo más alto. Las cinéticas del segundo se presentan a continuación en los párrafos 6.3.3.

### 6.3.3. Burbujeo alto

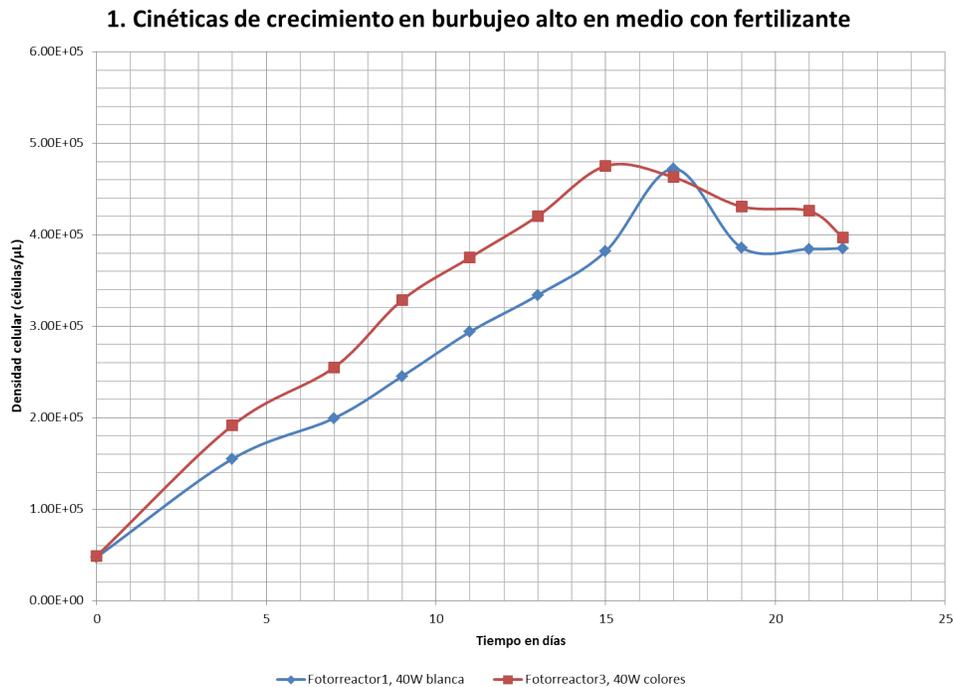


Figura 6.17: Cinéticas de crecimiento en medio con fertilizante en un nivel de burbujeo alto

## 2. Cinéticas de crecimiento en burbujeo alto en medio con fertilizante

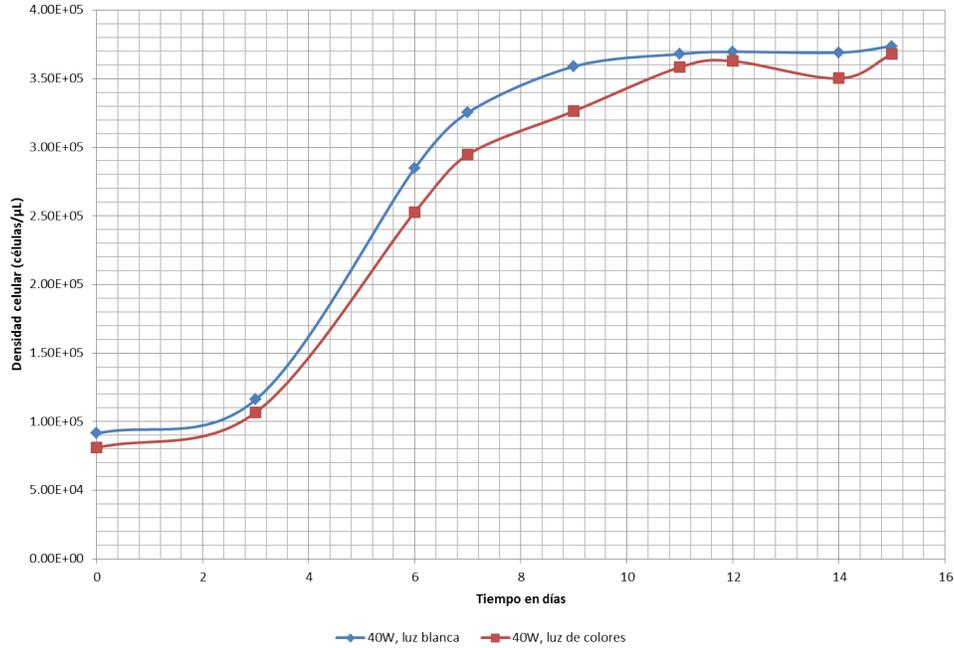


Figura 6.18: Réplica cinéticas de crecimiento en medio con fertilizante en un nivel de burbujeo alto

Cuadro 6.7: Densidad celular máxima alcanzada para dos niveles de burbujeo

	Densidad celular máxima alcanzada (células/ $\mu L$ )					
	Burbujeo bajo (53L/h)			Burbujeo alto (90L/h)		
	Cinética 1	Cinética 2	Promedio	Cinética 1	Cinética 2	Promedio
40W luz blanca	5.04E+05	2.91E+05	3.98E+05	4.72E+05	3.70E+05	4.21E+05
40W luz de colores	5.19E+05	3.67E+05	4.43E+05	4.75E+05	3.63E+05	4.19E+05

Cuadro 6.8: Productividades promedio a los 15 días para dos niveles de burbujeo

	Productividad promedio a los 15 días (células * $\mu L^{-1}$ * $das^{-1}$ )					
	Burbujeo bajo (53L/h)			Burbujeo alto (90L/h)		
	Cinética 1	Cinética 2	Promedio	Cinética 1	Cinética 2	Promedio
40W luz blanca	2.65E+04	2.66E+04	2.65E+04	2.23E+04	1.98E+04	2.11E+04
40W luz de colores	2.86E+04	2.86E+04	2.86E+04	2.84E+04	1.92E+04	2.38E+04

**Analysis of Variance for concentracion\_celular - Type III Sums of Squares**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A:burbujeo	233873.	1	233873.	0.00	0.9962
B:BLOCK	9.51956E8	1	9.51956E8	0.10	0.7631
RESIDUAL	4.6968E10	5	9.3936E9		
TOTAL (CORRECTED)	4.79202E10	7			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Multiple Range Tests for concentracion\_celular by burbujeo**

Method: 95.0 percent LSD

burbujeo	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
alto	4	419959.	48460.3	X
bajo	4	420301.	48460.3	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
alto - bajo		-341.96	176171.

\* denotes a statistically significant difference.

Cuadro 6.9: Tabla ANOVA y test de rangos múltiples para dos niveles de burbujeo

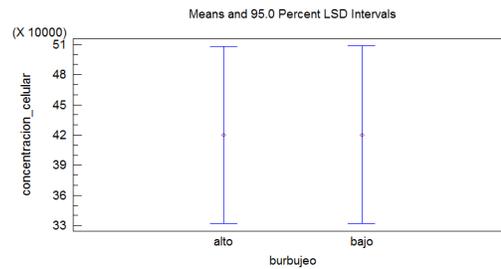


Figura 6.19: Comparación de rangos LSD, burbujeo

El segundo experimento concluye que no hay diferencias estadísticas entre un nivel de burbujeo de 53L/h y 90L/h.

## 6.4. Apreciaciones cualitativas del diseño

Como se mencionó anteriormente, el diseño presentó zonas de sedimentación cerca de las paredes del cilindro, como se ve en la Figura 6.20 en las imágenes de la izquierda.



Figura 6.20: Adherencia y sedimentación de la microalga *Chlorella sorokiniana*

La microalga *Chlorella sorokiniana* presenta tendencias de adherencia a la pared como lo muestra la Figura 6.20 en las imagen de la tapa del reactor. Para la fácil limpieza del reactor, se usó el cepillo de la imagen superior derecha. Minimizar las zonas de difícil acceso y limpieza se convierte entonces en una prioridad, lo que justifica en este caso un *downcomer* sobredimensionado.

Ni el medio Bristol, ni el medio con fertilizante cuentan con una fuente de carbono (como azúcares, carbonatos o lípidos) por lo que este elemento, en la cinéticas realizadas, provino del  $CO_2$  burbujeado en el aire. El medio con fertilizante tiene mayor concentracin de compuestos que el medio Bristol y por esta razón es mucho más duradero demostrando además que *Chlorella sorokiniana* se adapta a medios con diferentes concentraciones. Sin embargo, solo un anlisis de consumo del medio puede concluir sobre el buen balance de estos medios.

Se notó una leve diferencia de color entre el cultivo expuesto a luz blanca y el cultivo expuesto a luces de colores. Sin embargo, el barrido en espectro de la luz visible no dio cuenta de una diferencia significativa en la curvas.

# Capítulo 7

## Conclusiones

En este trabajo se diseñó y construyó un reactor *airlift* de tubos concéntricos porque, a diferencia de la estructura cilíndrica de tubos divididos o de la de placas planas, la configuración escogida minimiza los puntos de pega (zonas de posibles fugas) y no presenta ángulos bruscos de difícil acceso y limpieza. Además, la bibliografía, entre ella artículos como el de [Contreras et al., 2003], lo presenta como un reactor cerrado de alta densidad celular.

En el modelo de reactor construido, la relación entre la altura y el diámetro quedó en 3 y entre el área del *riser* y del *downcomer* de 7. Estas relaciones de forma delatan una configuración de poca altura, con un *downcomer* ligeramente sobredimensionado, puesto que los modelos de cálculo aconsejan dimensiones de más de 2 para  $h/D_b$  y 1.04 para  $A_d/A_r$ . La elección del tamaño en la altura obedeció también a consideraciones de estabilidad y sujeción del reactor, mientras que la distancia entre los tubos respondió a consideraciones de accesibilidad y de limpieza en la base.

Como material para el montaje se eligió el polimetilmetacrilato, en vista de que es el segundo polímero más transparente (93 % de transparencia) después del tetrametilfluoroetileno comúnmente comercializado. La densidad de este polímero es más baja que la del vidrio, además de ser muy estable y poder contar con la facilidad de varios talleres en Medellín que se dedican a su termoformado. Con todo, este PMMA presenta el inconveniente de rayarse y opacarse con algunas sustancias, pero puede pulirse.

Dado el notable papel que juega actualmente el control automático en el diseño y operación de reactores, se optó por un control con un micro-PLC, en razón de su robustez, fiabilidad, opciones de programación y expansión. La temporización de la iluminación se hizo cableando un AL2-14MR-D<sup>TM</sup> de Mitsubishi®.

La actual bibliografía sobre reactores *airlift* le da mucha importancia a la configuración del separador de gases sin prestarle mucha atención a la base. En contraste, este trabajo llevó a considerar la base como una zona neurálgica en el diseño de reactores *airlift*, pues allí se presenta con más facilidad el fenómeno de puntos muertos que crean zonas de sedimentación; además de que en esta zona se

localizan las mayores fuerzas y velocidades. Debido a una base plana y a un *downcomer* sobredimensionado, la configuración de reactor seleccionada presentó una zona de sedimentación con *downcomer* en la base cercana a la pared del cilindro. Por otra parte, el pequeño tamaño de los orificios que comunican al *riser* y el *downcomer* en esta zona, provoca altas fuerzas y velocidades.

El análisis de las curvas de crecimiento evidenció un decaimiento celular que empieza más temprano y de manera más pronunciada en medio Bristol. Este decaimiento se explica por la rapidez del agotamiento de este medio menos concentrado que el medio con fertilizante.

La microalga cultivada resultó siendo muy sensible a la intensidad de luz aportada. Se obtuvieron mejores crecimientos con potencias de iluminación de 40W, alcanzado así densidades celulares de  $5.70\text{E}+05$  células  $\mu\text{L}^{-1}$  y productividades de  $2.86\text{E}+04$  células día<sup>-1</sup>  $\mu\text{L}^{-1}$ . El tratamiento con 20W, en cambio, dio densidades celulares más bajas de  $2.71\text{E}+05$  células  $\mu\text{L}^{-1}$ . Por último se observó también que el tratamiento con luces de colores presentó algunos crecimientos más acelerados, pero estadísticamente no es mejor que aquel con luz blanca. [Kumar and Das, 2012] obtuvo  $4.4\text{gL}^{-1}$  peso seco de *Chlorella sorokiniana* de un fotorreactor en columna de burbujeo, lo que es superior al mayor peso seco obtenido en los *airlift* de  $3.2\text{gL}^{-1}$ .

Respecto al burbujeo se notó que con altos niveles (93L/h) solo se presenta una fase más larga para ciertos tratamientos, pero que los crecimientos fueron iguales.

# Capítulo 8

## Recomendaciones

Se mencionan las dificultades y errores tenidos en este trabajo, con el propósito de contribuir así al mejoramiento de futuros diseños y de dar elementos para la concepción de otros proyectos.

En el presente trabajo no se logró una correlación entre el peso seco de biomasa y la densidad óptica del cultivo y por ende no se tomó este camino para el análisis cinético. Debe entonces afinarse el método para obtener dicha curva, asegurándose de la calibración de las balanzas, filtrando volúmenes más importantes y asegurándose de que elementos sólidos (como pedazos de medio no disueltos) no alteren la medición.

Debe implementarse un mejor protocolo para la preparación del inóculo. Este trabajo realizó las inoculaciones con materia de la cinética anterior, lo cual puede afectar, según su estado, las cinéticas siguientes.

Para lograr reactores esbeltos con trayectorias de luz más cortas, sin tener problemas de estabilidad, se puede pensar en modelos colgados y sujetos en lugar de puestos. Cortas trayectorias de luz garantizan más disponibilidad de luz, condición necesaria para alcanzar altas concentraciones celulares.

El problema de zonas poco accesibles en el reactor persiste; la solución para su limpieza sigue siendo la de cepillos largos concebidos para tal fin. Los problemas de puntos muertos y zonas de sedimentación en la base, ameritan la evaluación de otras formas de base o mecanismos de levantamiento, ya sea por adiciones de aire o medios mecánicos. Estas ideas llevan consigo otros retos de fabricación.

El micro-PLC instalado no aprovecha todo su potencial porque todavía puede instalarsele, por ejemplo, un módulo de termocuplas que se destine al sensado de la temperatura. También puede aprovecharse una de sus salidas disponibles para la conexión de un cordón calefactor aislado en silicona para un control térmico.

Así mismo la instalación de más fuentes de luz y la programación de curvas de luz pueden ser estudiadas.

También la evolución de otras características de los reactores construidos, tales como el tiempo de mezclado, puede ser analizada con métodos de trazadores como en [Sánchez et al., 2004].

La evaporación del medio de cultivo fue importante, lo que obligó a reponer el agua perdida con frecuencia. Un sistema de condensación o un sistema de humidificación del aire burbujeado pueden disminuir este efecto.

# Bibliografía

- [AmericaEconomia, 2013] AmericaEconomia (2013). El etanol y la controversia: alimento o combustible.
- [Becker, 1994] Becker, E. (1994). Microalgae: biotechnology and microbiology. *Cambridge University Press. Reino Unido*, page 293.
- [Benemann, 2000] Benemann, J. R. (2000). Hydrogen production by microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 12.
- [BioPlat, 2010] BioPlat (2010). Energía de la algas presente y futuro. *Plataforma Tecnológica Española de la Biomasa*.
- [Chisti, 2007] Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25:294–306.
- [Contreras et al., 2003] Contreras, C., na, J. M. P., Flores, L. B., and nizares, R. O. C. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28:450–457.
- [Dah-Wei et al., 2012] Dah-Wei, D., Ramaraj, R., and Honglay, P. (2012). Growth condition study of algae function in ecosystem for co2 bio-fisiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 107:27–34.
- [Doran, 1998] Doran, P. M. (1998). *Pricipios de ingeniería de los bioprocesos*. Acribia S.A.
- [FAO, 2012] FAO (2012). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. *Coleccin FAO*.
- [Gutiérrez and Vara, 2008] Gutiérrez, H. and Vara, R. D. L. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. Mc Graw Hill, segunda edición edition.
- [H.Raven et al., 2007] H.Raven, P., F.Evert, R., and E.Eichhor, S. (2007). *Biologie végétale*. trad. de la 7ième édition américaine Jules Bouharmont et révision scientifique Charles-Marie Evrard).
- [Huang et al., 2010] Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., and Chen, G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87:38–46.

- [Kumar and Das, 2012] Kumar, K. and Das, D. (2012). Growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in airlift and bubble column photobioreactors. *Biore-source Technology*, 116:307–313.
- [Lizardi, 2011] Lizardi, M. A. (2011). Contribución al estudio de la hidrodinámica y transferencia simultánea de masa en biorreactores airlift de tres fases: producción de un consorcio microbiano degradador de petróleo. Master’s thesis, Universidad Autónoma Metropolitana.
- [Martín, 2001] Martín, R. D. (2001). Estudio del flujo en reactores de con tres fases por simulación. Master’s thesis, Universidad complutense de Madrid.
- [Merchuk and Gluz, 2010] Merchuk, J. and Gluz, M. (2010). Bioreactors, air-lift reactors. pages 320–353.
- [Morit et al., 2001] Morit, M., Watanabe, Y., and Saiki, H. (2001). Instruction of microalgal biomass production for practically higher photosynthetic performance using a photobioreactor. *ICHEM*, (79):176?–183.
- [PrecioPetroleo, 2013] PrecioPetroleo (2013).
- [Quevedo et al., 2008] Quevedo, C., Morales, S., and Acosta, A. (2008). Crecimiento de *scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae*, 15(A10):25–31.
- [Sachs, 2007] Sachs, I. (2007). The biofuels controversy. *United Nations Conference on Trade and Development*.
- [Sánchez et al., 2004] Sánchez, A., Cerón, M., García, F., Molina, E., and Chisti, Y. (2004). Mixing in bubble column and airlif reactors. *Trans IChemE*, 82(A10):1367–1374.
- [Shah et al., 1982] Shah, Y., Kelkar, B., and Godbole, S. (1982). Design parameters estimations for bubble column reactors. *AIChE Journal*, 28(3):342–351.
- [Unicef, 2013] Unicef (2013). Mejorar la nutrición infantil: el imperativo para el progreso mundial que es posible lograr. page 124.
- [Wang et al., 2008] Wang, B., Li, Y., Wu, N., and Lan, C. (2008). Co2 biomitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*, (79):707?–718.