



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN PROTOTIPO DE  
FOTOBIORREACTOR DISCONTINUO A ESCALA  
LABORATORIO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA  
ALGAL”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTOR: CRISTHIAN DAVID CHICAIZA ORTIZ**

**TUTOR: DR. GERARDO LEÓN M.SC.**

Riobamba - Ecuador

2017

© 2017, Cristhian David Chicaiza Ortiz.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

El Tribunal de trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: **“DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN PROTOTIPO DE FOTOBIORREACTOR DISCONTINUO A ESCALA LABORATORIO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA ALGAL”**, de responsabilidad del señor egresado Cristhian David Chicaiza Ortiz, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

**NOMBRE**

**FIRMA**

**FECHA**

Dr. Gerardo León MSc.

-----

-----

**DIRECTOR DE TRABAJO  
DE TITULACIÓN**

Ing. Sofía Godoy MSc.

-----

-----

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Cristhian David Chicaiza Ortiz, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación, y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos del presente trabajo de titulación.

-----  
Cristhian David Chicaiza Ortiz  
C.C. 1500637887

## **DEDICATORIA**

A mis padres Fabián y Marcia; mis hermanos Ángel y Jumandy; amigas y amigos les dedico este trabajo con mucha estima.

## AGRADECIMIENTO

A Dios y su amor diario, me ha enseñado a valorar cada instante y ser feliz.

A mis padres, no me alcanzaría la vida para devolverles todo lo que han hecho por mí, sus enseñanzas coherentes con sus acciones, hacen que me sienta orgulloso de tener la mejor familia del mundo; a mi hermano Ángel, que ha acompañarme en cada decisión, por ser mi ejemplo a seguir y un entrañable amigo de vida; a mi hermano Jumandy, en su corta edad se ha vuelto una parte muy valiosa en mi vida.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, que me ha brindado oportunidades extraordinarias y me ha permitido encontrarme con amigos a quienes valoro mucho, Christian, Diana, Rocío, Ana Belén, Jesica, Andrea, Joselyn, Jéssica, Noemí, Mary, Alejandra, Jennifer, Daniela, Felipe; al grupo de apoyo en el laboratorio de Biotecnología, Jairon, Miguel, Lizeth, Paola, Geraldine, Luisa, Carmen.

Al Dr. Gerardo León, MSc Sofía Godoy, por sus valiosas orientaciones durante la realización del presente trabajo; a los técnicos docentes de la facultad de Ciencias, MSc. Maritza Yáñez, Lic. Fausto Tapia, Dra. Aida Fierro, MSc. Diego Vinueza.

De manera especial a Roberth Gutierrez, de la Universidad de Guayaquil; al Ing. Iván Choez, técnico de la Escuela Politécnica del Litoral, a la Dra. Moraima Mera y Dra. Candida Shinn de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra.

*Cristhian Chicaiza*

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Microalgas verde y naranja (carotenoide) <i>Chlorella vulgaris</i> .....	8
Figura 2-1. Microalga verde <i>Scenedesmus sp.</i> .....	9
Figura 3-1. Cultivo a gran escala de microalgas .....	12
Figura 4-3. Ubicación de los laboratorios donde se realizó el trabajo de titulación.....	29
Figura 5-3. Adecuación del área de .....	30
Figura 6-3. Estudiantes de Ingeniería en.....	30
Figura 7-3. Preparación del medio de cultivo .....	31
Figura 8-3. Mantenimiento de microalgas en el.....	31
Figura 9-3. Geometría y medidas del prototipo de fotobiorreactor discontinuo. ....	33
Figura 10-3. Medición del flujo .....	35
Figura 11-3. Materiales utilizados en la construcción del prototipo. ....	36
Figura 12-3. Vista frontal, longitudinal y de planta del prototipo de fotobiorreactor .....	38
Figura 13-3. Medición de la intensidad lumínica utilizando un Sensor-Unit .....	42
Figura 14-3. Preparación de medio de cultivo BG11 en una cámara de flujo laminar. ....	42
Figura 15-3. Colocación de los cilindros de acrílico con medios BG11 .....	43
Figura 16-3. Medición de Absorbancia en .....	44
Figura 17-3. Limpieza del equipo antes de su uso. ....	46
Figura 18-3. Puesta en marcha del prototipo .....	46
Figura 19-3. Sedimentación de las microalgas al cabo de 4 días:.....	49
Figura 20-3. Biomasa húmeda recolectada: a) <i>Scenedesmus</i> b) <i>Chlorella</i> .....	50
Figura 21-3. Centrifugación de las muestras de biomasa algal .....	50
Figura 22-3. Biomasa húmeda centrifugada a 840 rpm por 6 minutos .....	50
Figura 23-3. Separación del sobrenadante.....	51
Figura 24-3. Liofilización de las muestras: <i>Scenedesmus</i> (izquierda) y <i>Chlorella</i> (derecha).....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Composición del medio de cultivo para microalgas: Blue - Green Medium.....	10
Tabla 2-1. Composición del medio de cultivo para microalgas: Bold's Basal Medium .....	11
Tabla 3-1. Tipos de reactores, ventajas y desventajas .....	13
Tabla 4-1. Conversión de unidades de densidad de flujo de fotones para la luz visible .....	15
Tabla 5-3. Costo de los materiales empleados en la construcción del prototipo.....	39
Tabla 6-3. Costos de materiales y reactivos de laboratorio para la construcción del prototipo. ..	40
Tabla 7-3. Costos adicionales de servicios adicionales a la construcción del prototipo.....	41
Tabla 8-3. Datos obtenidos de las mediciones de intensidad lumínica en los cilindros .....	41
Tabla 9-3. Experimento preliminar, modificación de la solución madre 1 .....	43
Tabla 10-3. Primer lote de producción de microalgas .....	44
Tabla 11-3. Control de pH del primer lote de producción de microalgas .....	45
Tabla 12-3. Segundo lote de producción de microalgas .....	45
Tabla 13-3. Control de pH del segundo lote de producción de microalgas.....	46

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3. Primer lote de producción de microalgas. ....	47
Gráfico 2-3. Segundo lote de producción de microalgas. ....	47
Gráfico 3-3. Resultados de la pregunta 1 de la primera encuesta.....	52
Gráfico 4-3. Resultados de la pregunta 2 de la primera encuesta.....	53
Gráfico 5-3. Resultados de la pregunta 3 de la primera encuesta.....	53
Gráfico 6-3. Resultados de la pregunta 4 de la primera encuesta.....	53
Gráfico 7-3. Resultados de la pregunta 5 de la primera encuesta.....	54
Gráfico 8-3. Resultados de la pregunta 6 de la primera encuesta.....	54
Gráfico 9-3 Resultados de la pregunta 2 de la segunda encuesta.....	55
Gráfico 10-3. Resultados de la pregunta 2 de la segunda encuesta. ....	55
Gráfico 11-3. Resultados de la pregunta 3 de la segunda encuesta. ....	56
Gráfico 12-3. Resultados de la pregunta 4 de la segunda encuesta. ....	56
Gráfico 13-3. Resultados de la pregunta 2 de la segunda encuesta. ....	57

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ec. 1-1.	Cantidad de energía suministrada a las algas.....	14
Ec. 2-1.	Productividad volumétrica.....	17
Ec. 3-1.	Tasa de fijación de dióxido de carbono.....	18
Ec. 4-1.	Dióxido de carbono fijado por unidad de biomasa.....	18
Ec. 5-2.	Volumen del cilindro utilizado con medio de cultivo y microalgas .....	22
Ec. 6-2.	Volumen del cilindro .....	22
Ec. 7-2.	Altura ocupada con medio de cultivo y microalgas.....	23
Ec. 8-2.	Altura libre.....	23
Ec. 9-2.	Caudal de aire.....	24
Ec. 10-2.	Caudal de dióxido de carbono.....	23

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A Modelo de la primera encuesta aplicada a los estudiantes de noveno semestre de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH antes de la realización de la práctica de laboratorio
- ANEXO B Modelo de la segunda encuesta aplicada a los estudiantes de noveno semestre de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH posterior a la realización de la práctica de laboratorio
- ANEXO C Construcción de prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio para la producción de biomasa algal
- ANEXO D Desarrollo de la práctica de laboratorio con los estudiantes de Ingeniería en Biotecnología Ambiental
- ANEXO E Determinación de grupos funcionales realizados en el Infrarrojo para *Chlorella* y *Scenedesmus* a las 3 semanas de cultivo
- ANEXO F Registro de asistentes en la práctica de laboratorio preparada para los estudiantes de novenos semestre de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH.
- ANEXO G Manual de uso de un prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN .....	xvii
JUSTIFICACIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	4
1.1    General .....	4
1.2    Específicos.....	4
ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>7</b>
1.1    Cultivo de microalgas.....	7
1.1.1 <i>Chorella vulgaris</i> .....	8
1.1.2 <i>Scenedesmus sp</i> .....	9
1.2    Medios de cultivo para microalgas .....	10
1.3    Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas.....	11
1.4    Fotobiorreactores.....	12
1.4.1 <i>Consideraciones para el diseño de fotobiorreactores tubular</i> .....	14
1.4.2 <i>Parámetros de evaluación de rendimiento de fotobiorreactores</i> .....	17
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2    MARCO METODOLÓGICO .....</b>	<b>19</b>
2.1    Diseño experimental.....	19
2.1.1 <i>Tipo y diseño de investigación</i> .....	19
2.1.2 <i>Unidad de Análisis</i> .....	19

2.1.3	<i>Población de Estudio</i> .....	19
2.1.4	<i>Tamaño de Muestra</i> .....	20
2.1.5	<i>Selección de muestra</i> .....	20
2.2	<b>Metodología</b> .....	21
2.2.1	<i>Localización de la experimentación</i> .....	21
2.2.2	<i>Adecuación del lugar</i> .....	21
2.2.3	<i>Obtención de las microalgas</i> .....	21
2.2.4	<i>Mantenimiento de las microalgas</i> .....	21
2.2.5	<i>Diseño del prototipo de fotobiorreactor</i> .....	22
2.2.6	<i>Geometría del fotobiorreactor</i> .....	24
2.2.7	<i>Selección de materiales</i> .....	24
2.2.8	<i>Construcción del prototipo de fotobiorreactor</i> .....	24
2.2.9	<i>Costos de construcción del prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio</i> .....	24
2.2.10	<i>Pruebas experimentales del prototipo de fotobiorreactor</i> .....	24
2.2.11	<i>Demanda del prototipo de fotobiorreactor en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental- ESPOCH</i> .....	28
 <b>CAPÍTULO III</b>		
<b>3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....		<b>29</b>
3.1	<b>Análisis y discusión de resultados</b> .....	29
3.1.1	<i>Localización de la experimentación</i> .....	29
3.1.2	<i>Adecuación del lugar</i> .....	29
3.1.3	<i>Obtención de las microalgas</i> .....	30
3.1.4	<i>Mantenimiento de las microalgas</i> .....	31
3.1.5	<i>Diseño del prototipo de fotobiorreactor</i> .....	32
3.1.6	<i>Construcción del prototipo de fotobiorreactor</i> .....	37
3.1.7	<i>Costos de construcción del prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio</i> .....	39
3.1.8	<i>Pruebas experimentales del prototipo de fotobiorreactor</i> .....	41

3.1.9 <i>Demanda del prototipo de fotobiorreactor en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental- ESPOCH</i> .....	52
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
µm	micrómetro
a	ancho de la base de la pirámide
ADC	Alta Densidad Celular
cm	centímetros
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	ion carbonato
ESPE	Universidad de las Fuerzas Armadas
ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
g	gramos
GEI	gases de efecto invernadero
h	altura
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	bicarbonato
I	densidad de flujo del fotón
IR	Infrarrojo
IPCC	Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático
kg	kilogramos
L	Litro
lx	lumen /m <sup>2</sup>
M	molaridad
m	metro
min	minutos
m/v	relación masa volumen
m <sup>2</sup>	metro cuadrado

m <sup>3</sup>	metro cúbico
N	normalidad
NaNO <sub>3</sub>	nitrate de Sodio
NaOCl	hipoclorito de sodio
nm	nanómetro
pH	potencial de hidrógeno
PUCE-SI	Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra
r	radio
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SENPLADES	Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo - Ecuador
T	duración de tiempo
USFQ	Universidad San Francisco de Quito
UV-Vis	Espectrometría ultravioleta-visible
V	Voltios
v/v	relación volumen volumen
w	ancho
W	watts
$\lambda$	Lambda, longitud de onda

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue diseñar y construir un prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio para la producción de biomasa algal. Se eligió un diseño de fotobiorreactor tubular de 15 litros de capacidad, distribuidos en 6 cilindros de acrílico, por sus ventajas de construcción y operatividad, los primeros tres contenían cepas de *Chorella vulgaris* y los tres restantes *Scenedesmus sp.* Se utilizaron materiales de metal, vidrio, acrílico y madera para la construcción del equipo; se empleó una fuente de luz basada en 6 lámparas LED, con una intensidad promedio de 841,91 lx, medidas en el interior de los cilindros del equipo; se controló el tiempo de exposición a la luz con un temporizador, programado en fotoperiodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad; se suministró dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) atmosférico al medio de cultivo a través de una bomba de aire, con un caudal de 0.0378 cm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub>/s; se realizó un control diario del pH, ajustándolo a un rango de 7.5 a 8.5; se registró la temperatura en el interior de los cilindros, al igual que los valores de absorbancia, medidos a 750 nm por 3 semanas de cultivo, para evaluar el crecimiento de las microalgas. La biomasa obtenida fue sedimentada en recipientes de 20 L sin el uso de floculantes, el sobrenadante fue retirado, la biomasa húmeda se centrifugó por 6 minutos a 840 rpm, se descartó nuevamente el sobrenadante. Como resultado, las muestras se liofilizaron para obtener biomasa seca: 6.59 g de *C. vulgaris* y 9.74 g de *Scenedesmus sp.*, las 2 muestras se guardaron en refrigeración, concluyendo que existe mayor producción de *C. vulgaris* frente a *Scenedesmus sp.* Se recomienda que los docentes afines al área utilicen el prototipo en prácticas de laboratorio con los estudiantes para fortalecer su formación profesional.

**Palabras clave:** <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <BIOTECNOLOGÍA > <DISEÑO FOTOBIORRES> <CONSTRUCCIÓN> <FOTOBIORREACTOR> <PROTOTIPO> <CULTIVO MICROALGAS> <*Chlorella vulgaris*> <*Scenedesmus*>

## ABSTRACT

The objective of the present work was to design and construct a discontinuous photobioreactor prototype to laboratory-scale for the production of algal biomass. A tubular photobioreactor design of 15 liters capacity was chosen, distributed in 6 cylinders of acrylic, for its advantages of construction and operability, the first three contained strains of *Chorella vulgaris* and the remaining three of *Scenedesmus sp.* Metal, glass, acrylic and wood materials were used to construct the equipment; A light source based on 6 LED lamps was used, with an average intensity of 841.91 lx, measured inside the equipment cylinders. The time of exposure to the light was controlled with a timer, programmed in photoperiods of 12 hours of light and 12 hours of darkness; Atmospheric carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) was supplied to the culture medium through an air pump, at a flow rate of 0.0378 cm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub>/s; a daily pH control was performed, adjusting it to a range of 7.5 to 8.5; The temperature inside the cylinders was recorded, as well as the absorbance values, measured at 750 nm for 3 weeks of culture, to evaluate the growth of the microalgae. The biomass obtained was sedimented in 20 L containers without the use of flocculants, the supernatant was removed, the wet biomass was centrifuged for 6 minutes at 840 rpm, the supernatant was discarded again. As a result, the samples were lyophilized to obtain dry biomass: 6.59 g of *C. Vulgaris* and 9.74 g of *Scenedesmus sp.*, The 2 samples were stored in refrigeration, concluding that there is greater production of *C. Vulgaris* compared to *Scenedesmus sp.* It is recommended that teachers in the area use the prototype in laboratory practices with students to strengthen their professional training.

**Palabras clave:** <TECHNOLOGY AND SCIENCES OF ENGINEERING>, <BIOTECHNOLOGY><DESIGN PHOTOBIOREACTORS><CONSTRUCCIÓN> <FOTOBIOREACTOR><PROTOTYPE><MICROALGAS CULTURE><*Chlorella vulgaris*><*Scenedesmus*>

# INTRODUCCIÓN

## Situación Problemática

Existen limitaciones al momento de acceder a realizar prácticas de laboratorio por la falta de equipamiento apropiado a las asignaturas aprendidas, especialmente para los estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental, donde el costo de los equipos es alto, lo que limita su adquisición y también el aprendizaje integral de los estudiantes.

La producción industrial presenta una tendencia constante a incrementarse tanto en países desarrollados como en desarrollo, sin considerar en la mayoría de casos las repercusiones ambientales, lo que incide directamente sobre la demanda energética y la necesidad de agua en varios sectores, incluyendo la agricultura, el transporte, sectores comerciales y domésticos. (Sarin, 2012, pp.3) La demanda actual de energía es cubierta mayoritariamente por fuentes convencionales contaminantes, que con frecuencia conllevan la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera, dando lugar a la degradación atmosférica y a una alteración del ambiente. (Chawla, et al, 2014, pp. 1)

Existe escaso interés por encontrar soluciones sostenibles ante la emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera, tratamiento de aguas residuales urbanas y textiles, la producción de alimentos; siendo la industria basada en microalgas tanto de agua dulce como las provenientes de aguas marinas a diferentes escalas de cultivo una alternativa prometedora, a pesar de la baja inversión en proyectos de este tipo. (Li, et al., 2014, pp.162)

A pesar de las estimaciones para mediados del siglo XXI, donde el negocio de la producción de aceite de microalgas se convierta en una fuerza competitiva en el mercado de los combustibles, no existen un número significativo de proyectos que busquen optimizar sus procesos y abaratar costos. (Shiho, et al, 2012 pp. 90). El reto de las instituciones de nivel superior y centros de transferencia tecnológica es desarrollar proyectos que permitan el aprovechamiento de sistemas biológicos, generen recursos para la población y desarrollen nuevas líneas de investigación, por cuanto se vuelve imprescindible contar con un prototipo de fotobiorreactor que permita el cultivo de microalgas para la Facultad de Ciencias.

¿Es posible construir un prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio para producción de biomasa algal que contribuya en la formación de los estudiantes de la Facultad de Ciencias?

## **JUSTIFICACIÓN**

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en el centro territorial de Ecuador, ha venido formando profesionales de excelencia por más de 40 años, cuenta con grupos de investigación como el Grupo de Energías Alternativas y Ambiente, Centro de Investigación y Producción, que han destacado en eventos nacionales e internacionales. No obstante de ello, no se han empleado fotobiorreactores en esta prestigiosa institución.

Uno de los propósitos de este trabajo de titulación es complementar el aprendizaje teórico recibido en clases, por medio de actividades prácticas de laboratorio, que generen destrezas en los estudiantes de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, a través del uso del prototipo de fotobiorreactor propuesto en el presente trabajo de titulación, que permita a los estudiantes realizar experimentos a escala laboratorio de biotecnología, tratamiento de aguas residuales, microbiología y a su vez les brinde la confianza y motivación para realizar proyectos en materia de remediación ambiental, alternativas de desarrollo sostenible frente al cambio climático con las nuevas tendencias basadas en microalgas.

Los combustibles fósiles representan el 88% de generación de energía primaria, su combustión es la responsable del 73% de la producción de CO<sub>2</sub> y se estima que para el año 2042 los combustibles fósiles se terminen. (Krishna, et.al, 2012, pp. 47-48) El Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático, sugiere políticas nacionales y subnacionales a los países, en materia de adaptación y mitigación, el cambio a combustibles de bajas emisiones de carbono como los biocombustibles y el subsidio de los mismos para el transporte. (IPCC, 2014, pp.110,117) Otro factor influyente es la disminución de precios de las materias primas clave de biocombustibles, fortaleciendo la competitividad de la industria de los biocombustibles. (Renewables, 2015, pp. 45,46)

La producción de microalgas en fotobiorreactores tiene el potencial de dar respuesta positiva al uso exhaustivo de las combustibles convencionales que a diferencia de los combustibles de primera generación, éstos no afectan a la seguridad alimentaria ni son perjudiciales para el ambiente. (Gikonyo, et al, 2015) El trabajo con microalgas contribuye significativamente a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI); tienen el potencial de crear puestos de trabajo, mejorar en términos económicos a regiones emergentes y en desarrollo. (Jeswani & Azapagic, 2012)

Históricamente Ecuador ha basado su economía en la extracción y venta de crudo, lo que ha llevado a períodos críticos para sus habitantes por el descenso de la producción del mismo, sus externalidades también son ambientales, varios casos de derrames de crudo principalmente en provincias de la Amazonía han permitido evidenciar la necesidad de diversificar la economía con proyectos de menor impacto ambiental. (INREDH, s.f)

El Plan Nacional del Buen Vivir 2013 – 2017 de Ecuador, en su objetivo 7 busca “garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental territorial y global”, a la vez que promueve el uso de biotecnología, protegiendo la soberanía alimentaria (SENPLADES, 2013, pp 82,128)

Una de las áreas con auge es la biotecnología algal, las microalgas son las responsables de la producción de aproximadamente la mitad del oxígeno atmosférico en la tierra y la absorción de grandes cantidades de dióxido de carbón de la atmósfera, su cultivo en fotobiorreactores requiere de extensiones relativamente pequeñas en terrenos no cultivables, no pone en riesgo la seguridad alimentaria (Safi, 2014, pp. 266-268).

Con este trabajo de titulación, se busca despertar el interés en los estudiantes de la Facultad de Ciencias, en especial de quienes optaron por la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH, para continuar desarrollando investigación en esta área, teniendo la posibilidad de contar con un prototipo de fotobiorreactor, herramienta que permite el cultivo de microalgas en un volumen de 15 L, para el desarrollo de prácticas de laboratorio en diferentes asignaturas y trabajos de fin de carrera.

## **OBJETIVOS**

### **1.1 General**

- Diseñar y construir un prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio para la producción de biomasa algal.

### **1.2 Específicos**

- Evaluar la necesidad de un prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio para los estudiantes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH
- Desarrollar el diseño y construcción del prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio.
- Comparar la producción de biomasa generadas por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* al cabo de 3 semanas.
- Realizar un manual de uso para el prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio.

## ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

El cultivo de microalgas a gran escala es reciente en comparación al cultivo de plantas, los primeros en proponer que ciertas microalgas como las diatomeas, podrían ser fuentes adecuadas de lípidos, alimento y para la obtención de combustibles fueron Harder and von Witsch en 1942, mientras que Milner en 1951 ya consideraba la posibilidad de la producción fotosintética de aceites a base de algas. El primer estudio de uso de un fotobiorreactor internamente iluminado se desarrolló en 1952 por Aach. Estudios posteriores demostraron que las microalgas podrían acumular niveles muy altos de lípidos, sin embargo, la productividad real de lípidos era baja, su interés de aplicación se enfocó en el aprovechamiento de proteínas y alimentos. (Borowitzka & Moheimani, 2013 pp.1-4)

El cultivo comercial de microalgas tiene alrededor de 60 años, entre 1950 y 1951 en la Universidad de Standford se realizó el cultivo a gran escala de *Chlorella* por Cook, trabajo registrado como el primero al contar con un contrato con Arthur D. Little. En 1948 en Alemania, Witsch producía a gran escala en invernaderos y al aire libre *Chlorella*; cabe indicar que paralelamente en el Instituto de Tokugawa en Tokio-Japón también se realizaban estudios en plantas pilotos de microalgas. (Hele, 2005 pp.7-9). Estos son los primeros pasos a mediana escala desarrollados en los 2 extremos del planeta.

En el contexto ecuatoriano, las universidades que cuentan con un estudio en este campo son: la Universidad San Francisco de Quito con el tema “Evaluación de las condiciones de cultivo autotrófico de microalgas *Chlorella* para la producción de Biodiesel” realizado en 2013 (Dávila & Ochoa, 2013 pp. 14-21); la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra ha desarrollado este línea de investigación desde 2008: “Evaluación de algas unicelulares en ambientes cerrados para la captura de gases de combustión” (PUCE-SI, 2014); y la Universidad de las Fuerzas Armadas ha desarrollado la siguiente tesis en 2013 “Diseño, construcción y puesta en marcha de un fotobiorreactor piloto para el crecimiento de la microalga *Chlorella sp* en el laboratorio de biotecnología y energías renovables de la Empresa Eléctrica Quito” (Sandoval, 2013, pp. 121) donde actualmente se están optimizando procesos, especialmente de mayor producción de lípidos y reducción de tiempos. La Escuela Superior Politécnica del Litoral desarrolló una propuesta de diseño de un fotobiorreactor industrial para cultivo de microalgas destinadas a la producción de biodiesel en la ciudad de Guayaquil. (Alvear, 2015, pp. 4-5).

En el año 2014, en Ecuador, como resultado de un convenio entre la Empresa Eléctrica Quito y la Corporación para la Investigación Energética, se inauguró un laboratorio de Biotecnología con

10 fotobiorreactores en Cumbayá orientado a la producción de biodiésel y la consolidación de un catálogo de algas nativas del país. (Carvajal, et al, 2015)

En la provincia de Imbabura en Ecuador, el profesor Spiros Agathos, Decano del Colegio de Ciencias de la Vida y Biotecnología de Yachay Techm, trabaja con microalgas de ambientes extremos, tolerantes a temperaturas hostiles y con altos contenidos salinos; utiliza un fotobiorreactor para simular las condiciones del desierto del Sahara, de donde fueron recolectadas las especies que aisló, con el objetivo de obtener compuestos como los antioxidantes, que pueden formar parte de suplementos de salud; También se busca a escala laboratorio la manipulación genéticamente Chlamydomonas, que son más eficientes en la producción de compuestos valiosos como los biofármacos. Paralelamente, el Dr. Si Amar Dahoumane, docente de la misma institución, emplea las microalgas a manera de nano-bio-fábricas, como un medio para producir sustentablemente nano partículas inorgánicas de oro, plata y compuestos bi-metálicos. (Ycaza, 2016).

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Cultivo de microalgas

Para el cultivo de algas se han diseñado sistemas abiertos y cerrados. Un sistema abierto es la forma más común de producción y barata para la producción de biomasa a gran escala. Su construcción normalmente se realiza junto a las plantas de energía o la industria pesada, que descargan grandes cantidades de dióxido de carbono, la profundidad óptima del estanque es 15-50 cm para permitir la exposición de la luz solar, necesaria en la fase de crecimiento exponencial; presentan diversos inconvenientes: pérdidas de agua por evaporación, la transferencia de CO<sub>2</sub> no es distribuida adecuadamente y las condiciones de cultivo no pueden controlarse totalmente, por ello es propenso a contaminación, se requiere de extensiones grandes de terreno, agitación y amplios periodos de obtención (6 a 8 semanas) por la poca influencia de la luz en los estratos bajos. (Pulz & Scheibenbogen, 1998, pp. 147-148)

Los sistemas cerrados poseen ventajas importantes, se aplican para obtener una concentración mayor de biomasa y mejor calidad en cuanto a productos farmacéuticos puros, nutracéuticos y cosméticos. Además, estos sistemas son más apropiados para cepas sensibles que no pueden competir y crecer en medio hostil. La alimentación de la biomasa se realiza con CO<sub>2</sub> por medio de burbujeo, la iluminación a través de luces fluorescentes, los tubos que contienen las microalgas son generalmente de 20 cm o menos de diámetro y el grosor de sus paredes transparentes en la escala de milímetros, lo que permite la absorción de luz apropiada. Existen varios diseños como fotobiorreactor de placa plana, fotobiorreactor tubular, fotobiorreactor en forma de columna (Safi, 2014, pp. 268)

Para el cultivo de microalgas, los métodos actuales se basan en producción en lotes, semi-continuo o cultivo continuo, la mayoría de los cultivos continuos y semicontinuos se implementan en fotobiorreactores estrictamente controlados, que minimizan la introducción de contaminantes atmosféricos porque estos cultivos tienden a ser operado durante un período de tiempo mucho más largo que los cultivos por lotes. (Tredici, et al, 1999 pp. 617-620).

El cultivo de las microalgas se recomienda realizarlo en 2 etapas: una fase de crecimiento celular con las condiciones y nutrientes adecuados para cada especie, seguida de una etapa de estrés,

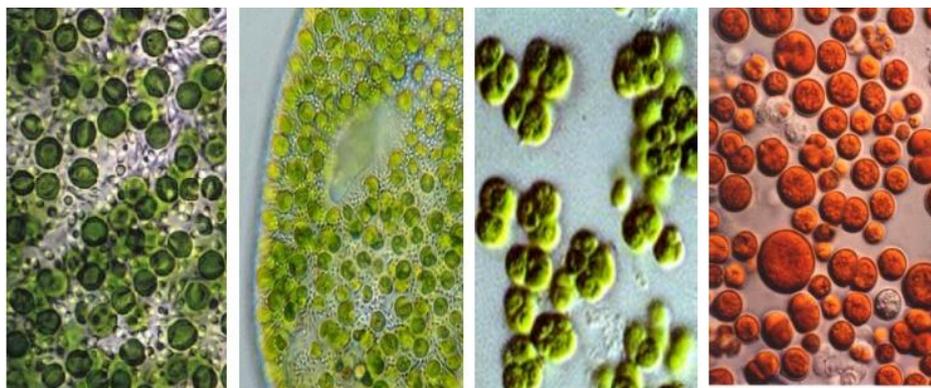
como la deficiencia de nutrientes: nitrógeno para el caso de las algas y silicio para las diatomeas, lo que induce la acumulación de lípidos. (Huesemann, et al, 2010 pp. 170-171)

### 1.1.1 *Chorella vulgaris*

*Chlorella* pertenece a las eucariotas, es un grupo de microalgas verdes capaz de reproducirse a sí misma en cuestión de horas, requiriendo únicamente de luz solar, dióxido de carbono, agua y una pequeña cantidad de nutrientes, es unicelulares no móvil, esférica o elipsoidal y el tamaño de las celdas pueden variar de 2 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro; se puede encontrar en agua dulce, de mar, suelo, puede vivir de forma simbiótica con líquenes y protozoos; se reproduce asexualmente a través de la producción de autoesporas, de una sola célula madre se puede producir entre 2 y 16 autoesporas. (Jin & Feng, 2016, pp. 2-3)

*Chlorella* se ha cultivado materia para la producción comercial de alimentos, productos para la salud en forma de pastillas y en polvo. El valor nutricional de *Chlorella* es debido a su alto contenido de proteínas (51 a 58% peso en seco) y los carotenoides, con una amplia gama de vitamina; p-glucano, que es un inmunoestimulador activo, y tiene otros efectos beneficiosos en la eliminación de los radicales libres y la reducción de lípidos de la sangre. (Wan, 2012, pp. 25)

*Chlorella* pertenece a la familia Chlorophyta, en condiciones de deficiencia de nitrógeno más otros tipos de estrés puede mantener una coloración naranja como en la figura 1-1 se estima una producción total de alrededor de 2.000 toneladas/año en la década de 1990 (Marques, et al, 2012, pp.6-7)



**Figura 1-1** Microalgas verde y naranja (carotenoide) *Chlorella vulgaris*

Fuente: (Marques, et al, 2012)

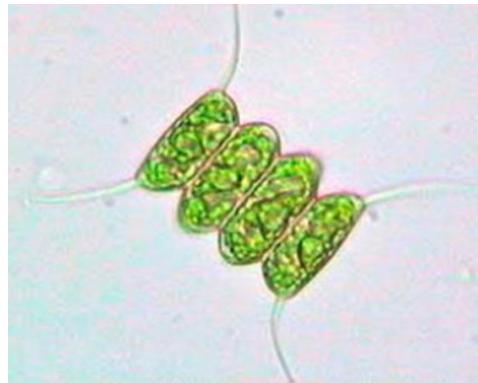
Para su crecimiento se requiere de nutrientes como: nitrógeno, fósforo, azufre, metales, carbono; el aire atmosférico contiene sólo 0,04% de  $\text{CO}_2$ , que no es suficiente para mantener su rápido crecimiento, por ello usualmente se suministra aire enriquecido con  $\text{CO}_2$  a la concentración de 1 a 5% a los cultivos. Niveles más altos de  $\text{CO}_2$  pueden disminuir el pH del medio, inhibiendo el crecimiento de las algas. En cuanto a Nitrógeno, *Chlorella* es capaz de utilizar nitrato, amoníaco y las fuentes orgánicas de nitrógeno como urea, glicina y aminoácidos. Otros nutrientes

inorgánicos incluyen K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo y, entre otros, en cantidades traza. A baja intensidad lumínica, *Chlorella* realiza la fotosíntesis de manera eficiente, se llega a saturar cuando la intensidad de luz alcanza un valor entre 80 y 400  $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$  por célula, pudiendo causar la destrucción de clorofila y provocar la muerte celular. (Jin, Feng, 2016, pp. 3-4)

### 1.1.2 *Scenedesmus sp*

Se puede encontrar en los cuerpos de agua dulce e incluso en el suelo, pueden tolerar diversas condiciones ambientales, son fáciles de cultivar y manejar; su reproducción es asexual por la formación de autoesporas; como se indica en la figura 2-1, las células madre pueden tener entre 1 y 4 divisiones sucesivas entre 2 a 16 células hijas, pero también muchas especies pueden producir organismos unicelulares. Las condiciones ambientales determinan que fenotipos se expresarán, provocando cambios morfológicos (Lürling, 2003, pp. 85-87)

Cambia su forma para adaptarse a gradientes en las condiciones que se establecen en el cultivo o la naturaleza, su uso potencial se enfoca a la producción de balanceados para animales, el enriquecimiento de piensos, bien sea para acuicultura como la industria cárnica, su composición de proteínas totales (24-35%), lípidos (2-3%), minerales (23-25%), nutrientes digeridos (56-60%), fibra bruta (10-15%), materia orgánica (35%); la presencia de carotenoides mejorar el color de la carne. (Sociedad Española de Microalgas y Subproductos, s.f)



**Figura 2-1** Microalga verde *Scenedesmus sp*.

**Fuente:** (Sociedad Española de Microalgas y Subproductos, sf)

Las poblaciones *Scenedesmus* pueden estar dominada por colonias cuatro y ocho células en lugar de estar aisladas, ya que las colonias pueden disuadir eficazmente la alimentación de sus depredadores, como *Daphnia cucullata*, este hecho favorece el mantenimiento de organismos unicelulares vulnerables. Sin embargo, la formación de grandes colonias de *Scenedesmus* acelera la sedimentación, perjudicando su acceso a la luz y disminuye de la posibilidad de captar nutrientes. (Zhu, 2015, pp. 1,2)

## 1.2 Medios de cultivo para microalgas

Un medio de cultivo es una disolución con los nutrientes inorgánicos que necesitan las microalgas para su crecimiento, está en función de la producción de biomasa, contiene una fuente de carbono, nitrógeno generalmente como nitritos y nitratos, fósforo como fosfato y otros componentes en función de la especie existen macronutrientes como: cloruro de sodio y magnesio, sulfatos, sales de calcio, micronutrientes: manganeso, cobre, cobalto, zinc, molibdeno, vanadio y otros. (Fernández, 2014)

Existe una diversidad de medios para el cultivo de microalgas, pueden ser naturales enriquecidos o artificiales, estos últimos son empleados con fines experimentales destinados a la obtención de resultados replicables tanto en la producción masiva como el mantenimiento de las microalgas. Cabe indicar que existen otros medios con vitaminas, aminoácidos para de microalgas auxótrofas, que no sintetizan a través de la fotosíntesis estos compuestos y pueden limitar su crecimiento (FAO, s.f)

Entre los medios de cultivo más empleados para el desarrollo de microalgas a nivel laboratorio se tienen los medios: Blue - Green Medium (BG11) y Bold's Basal Medium (BB) descritos en las tablas 1-1 y 2-1 respectivamente. (Scottish Association for Marine Science, sf, pp.1)

**Tabla 1-1:** Composición del medio de cultivo para microalgas: Blue - Green Medium

Solución madre (1)		g/L
1	Nitrato de sodio	15
Solución madre (2)		g/500 mL
2	fosfato de potasio bibásico	2
3	Sulfato de Magnesio heptahidratado	3.75
4	Cloruro de calcio	1.8
5	Ácido cítrico	0.3
6	Citrato de amonio férrico verde	0.3
7	EDTA disódico	0.05
8	Carbonato de sodio	1
Solución madre (3)		g/L
9	Ácido bórico	2.86
10	Cloruro de manganeso tetrahidratado	1.81
11	Sulfato de Zinc heptahidratado	0.22
12	Molibdato de sodio dihidratado	0.39
13	Sulfato cúprico pentahidratado	0.08
14	Nitrato de cobalto hexahidratado	0.05
Medio de cultivo		mL
Solución madre 1		100
Solución madre 2		10
Solución madre 3		1

**Fuente:** (Scottish Association for Marine Science, sf, pp.1)

Aforar a 1 litro con agua desionizada, ajustar el pH a 7,1 con NaOH 1 M o HCl. Para solidificar el medio, se añade 15 g/L de Agar Bacteriológico. Se autoclava a 15 psi durante 15 minutos.

**Tabla 2-1:** Composición del medio de cultivo para microalgas: Bold's Basal Medium

Solución madre (1-6)		g/400 mL
1	Nitrato de sodio	10
2	Sulfato de Magnesio heptahidratado	3
3	Cloruro de sodio	1
4	Fosfato de potasio dibásico	3
5	Fosfato de potasio monobásico	7
6	Cloruro de calcio	1

Solución madre (7-10)		g/l
7	Sulfato de Zinc heptahidratado	8.82
	Cloruro de manganeso tetrahidratado	1.44
	Óxido de molibdeno III	0.71
	Sulfato cúprico pentahidratado	1.57
	Nitrato de cobalto hexahidratado	0.49
8	Ácido bórico	11.4
9	EDTA	50
	Hidróxido de potasio	31
10	Sulfato ferroso heptahidratado	4.98
	Ácido sulfúrico concentrado	1

Medio de cultivo		mL
Solución madre 1-6		10
Solución madre 7-10		1

**Fuente:** (Scottish Association for Marine Science, sf, pp.1)

Aforar a 1 litro con agua desionizada o destilada.

### 1.3 Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas

Se puede obtener productos metabólicos como hidratos de carbono, proteínas, almidón, vitaminas, enzimas, polímeros, pigmentos, lípidos que pueden ser aprovechados como complementos alimenticios, piensos, biodiesel y productos de energía verde (conservación y reutilización de agua, mejorar la calidad de los suelos). Merece destacar el potencial de manipulación genética de rutas metabólicas, una amplia configuración de formas de cultivo, menor cantidad de agua frente a los cultivos tradicionales. (Bajpai, et al, 2014 pp. 3-5,178)

La figura 3-1 representa la producción a escala industrial de microalgas, que ha evolucionado en la última mitad de siglo, por ejemplo, *Chlorella sp* es cultivada en varios sistemas de producción: estanques circulares, rueda de paletas, estanques de rodadura mixta, fotobiorreactores tubulares. Alrededor de 5.000 toneladas de biomasa de *Chlorella sp.*, se producen en todo el mundo, principalmente en Japón y Taiwán (Lundquist, et al, 2010 pp.14)



**Figura 3-1** Cultivo a gran escala de microalgas  
 a) Producción de *Haematococcus pluvialis* 1 m de diámetro.  
 b) Producción de *Chlorella sp.* 500 m<sup>2</sup> cada estanque.

Fuente: (Lundquist, 2010 pp.14)

Las microalgas son empleadas para el tratamiento de: aguas residuales de origen municipal (después de haber atravesado su tratamiento convencional antes de su descarga), lixiviados de vertedero, efluentes de caucho y efluentes de la fabricación de aceites de palma, la disminución de color de aguas residuales textiles; como una herramienta biológica para la evaluación y seguimiento de los tóxicos ambientales: productos farmacéuticos, metales pesados y pesticidas; generación de biodiesel. Algunas microalgas como *Spirulina* y *Chlorella* son cultivadas para consumo animal y humano, debido a su alto valor nutricional. (Wan, et al 2012 pp. 24, 31-33)

Otra de las aplicaciones importantes de las microalgas corresponde a la captura de CO<sub>2</sub>, resultado de las emisiones de ciertas fábricas, se puede conducir un flujo de gases de combustión tras haber sido tratado previamente, con la consideración que el gas no contenga altos niveles de partículas en suspensión (NO<sub>x</sub> y SO<sub>x</sub>) que podrían mezclarse con el agua y generen de esta manera sus correspondientes ácidos, que desencadenarían en un descenso drástico de pH y la muerte del cultivo, por lo que los fotobiorreactores deben ser operados de manera controlada, procurando la máxima eficiencia en la captura e inyección de CO<sub>2</sub>, para ello debe conocer realizar un análisis químico del gas a inyectar en el cultivo. (CO<sub>2</sub>ALGAEFIX, 2015, pp. 67)

#### 1.4 Fotobiorreactores

Un fotobiorreactor busca evitar el contacto con el medio ambiente externo, para impedir contaminación y cambios bruscos en las condiciones internas del contenedor que podrían afectar a la biomasa, tiene condiciones más controladas de cultivo como la dosificación de nutrientes, una mejor distribución de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). (Tredici, et al. 1999 pp. 617-620). Los fotobiorreactores permiten un mejor control de las condiciones de cultivo que los sistemas abiertos, la productividad de biomasa es mayor. Se prevé que la biotecnología de las algas abriría paso al desarrollo del Sistema de Apoyo a la Vida Ecológica Cerrada, el reto actualmente es

utilizar eficazmente la energía solar para la producción de biomasa algal. Los fotobiorreactores tubulares horizontales e inclinados son prometedores excepto por la dificultad de escalarlos. (Ugwu, et al., 2008, pp. 2,3)

Los fotobiorreactores han encontrado aplicaciones en diferentes campos: farmacia, cosméticos y alimentos para la acuicultura, cabe señalar que el desarrollo de fotobiorreactores industriales aún requiere de esfuerzos de optimización, para lograr una alta tasa de producción. Los nuevos avances son más radicales para su aplicación en biorefinería. (Dauchet, et al, 2016). Existen diferentes tipos de fotobiorreactores, las ventajas y limitaciones son analizadas en la Tabla 3-1.

**Tabla 3-1:** Tipos de reactores, ventajas y desventajas

<b>Tipo de reactor</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Limitaciones</b>
Estanque de conducción (Raceway)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Relativamente barato</li> <li>- Fácil de limpiar</li> <li>- Entrada de baja energía</li> <li>- Fácil de mantener</li> <li>- Bueno para el cultivo en masa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pobre productividad de la biomasa</li> <li>- Gran área de tierra requerida</li> <li>- Limitado a unas pocas cepas de algas</li> <li>- Contaminación fácil del cultivo</li> <li>- Mezcla ineficiente</li> <li>- Pobre uso de dióxido de carbono</li> <li>- Baja longevidad del cultivo de algas</li> <li>- Pequeña superficie de iluminación</li> <li>- Control de temperatura difícil</li> <li>- Aumento de escala desafiante</li> </ul>
Fotobiorreactor tubular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gran superficie de iluminación</li> <li>- Baja contaminación</li> <li>- Buena productividad de la biomasa</li> <li>- Control de temperatura posible</li> <li>- Mezcla uniforme alcanzable</li> <li>- Escalabilidad razonablemente simple</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grado de ensuciamiento del crecimiento de la pared</li> <li>- Requiere amplias áreas del suelo.</li> <li>- Mezcla ineficiente de O<sub>2</sub> disueltos y gradientes de dióxido de carbono a lo largo de tubos</li> </ul>
Reactor plano	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevadas productividades de biomasa</li> <li>- Baja contaminación</li> <li>- Baja acumulación de O<sub>2</sub></li> <li>- Gran superficie de iluminación</li> <li>- Control de temperatura posible</li> <li>- Buen intercambio de gases posible</li> <li>- Combinación uniforme posible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Difícil de escalar</li> <li>- Grado de crecimiento / ensuciamiento de la pared</li> <li>- Pequeño grado de estrés hidrodinámico</li> </ul>
Reactor tipo columna	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Compacto</li> <li>- Gran transferencia de masa</li> <li>- Buena mezcla con bajo esfuerzo de cizalla</li> <li>- Bajo contenido de contaminación</li> <li>- Control de temperatura posible</li> <li>- Reducción de fotoinhibición y fotooxidación</li> <li>- Alto potencial de escalabilidad</li> <li>- Buen intercambio de gases posible</li> <li>- Combinación uniforme posible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Área de iluminación más pequeña</li> <li>- Caro comparado con estanques abiertos</li> <li>- Construcción sofisticada</li> <li>- Disminución de la superficie iluminada al aumentar la escala</li> </ul>

Fuente: (Moikebo, K., 2012 pp. 38,39)

### ***1.4.1 Consideraciones para el diseño de fotobiorreactores tubular***

La eficiencia energética de la producción de microalgas está determinada básicamente por la eficiencia de las propias células con respecto a la fotosíntesis y al anabolismo celular. La conversión foto-teórica (PCE) es de aproximadamente 9-10%, por lo cual los nuevos reactores deben proporcionar óptimas condiciones fisiológica y un mínimo de energía auxiliar. Para alcanzar el techo del PCE al 9%, los fotobiorreactores tienen que ser casi ideales con respecto a la transferencia de masa y luz. El crecimiento de las microalgas en fotobiorreactores cerrados depende de la transferencia de masa apropiada de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. (Borowitzka, et al, 2013 pp. 223-224)

Los tipos de diseños principales pueden ser de tipo cilíndrico, plano o tubular para lograr la máxima captura de luz. El aspecto de diseño importante de cualquier fotobiorreactor es que la luz incidente debe ser perpendicular a la superficie del reactor. El tetraedro tiene la mayor área de superficie iluminada por unidad de relación de volumen y el más bajo es el de una forma esférica. Por lo tanto, la superficie iluminada a la relación de volumen disminuye de la pirámide > panel plano > tubular > reactores en forma de cúpula. (Debabrata, 2015 pp. 104-105)

Para el diseño de reactores, se requiere de regiones soleadas, pero posiblemente pueden surgir otros problemas como el sobrecalentamiento durante el día, lo que hace necesario enfriar el agua, o no poder contar con la infraestructura necesaria, como un suministro de dióxido de carbono. La tasa de fotosíntesis aumenta linealmente con la intensidad de la luz sólo en los flujos de fotones bajos y permanece constante o incluso disminuye a niveles más altos, considerando que sólo una pequeña banda del espectro de energía solar es fotosintéticamente activa (400-740 nm). La acumulación de lípidos puede ser forzada por altas presiones parciales de CO<sub>2</sub>, no se dispone aún de valores fisiológicos exactos que permitan un ajuste preciso de los gases disueltos de acuerdo con las demandas fisiológicas de diferentes especies y condiciones de crecimiento. (Borowitzka, et al, 2013 pp. 225-226)

#### ***1.4.1.1 Energía luminosa***

La luz actúa como una fuente de energía para las algas, puede expresarse en cualquiera de estas unidades: lx, W m<sup>-2</sup> y μ mol fotón m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. pudiendo convertirse entre ellas como lo muestra la tabla 4-1. La energía luminosa total disponible para el crecimiento de las algas se expresa con la ecuación 1-1. (Debabrata, 2015 pp. 107)

$$E = I * A * T$$

(Ec. 1-1)

Donde:

E = Cantidad de Energía suministrada a las microalgas

I = Densidad de flujo del fotón es incidente.

A = Área superficial iluminada del fotobiorreactor

T = Duración de tiempo (h día<sup>-1</sup>)

**Tabla 4-1:** Conversión de unidades de densidad de flujo de fotones para la luz visible

Fuente de luz	$\mu \text{ mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	lx	$\text{W m}^{-2}$
Luz del sol	1	54	0.219
Lámparas de halogenuros metálicos	1	71	0.218
Luces fluorescentes blancas frescas	1	74	0.218
Incandescente	1	50	0.2

Fuente: (Debabrata, D., 2015 pp. 106)

Para la mayoría de los fotobiorreactores la densidad óptima del flujo de fotones es de 345 – 1125  $\mu \text{ mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Diferentes intensidades de luz, longitudes de onda y también el efecto de frecuencias de luz y oscuridad pueden afectar la forma en que las algas se desarrollan y reproducen, sin embargo, la intensidad óptima de luz para las algas es 5-10 veces menor que la intensidad de luz solar promedio, por ello el reto del aprovechamiento de la luz solar para abaratar costos. (Mokebo, 2012 pp. 44,45)

En la literatura existen otras afirmaciones respecto a la intensidad de luz óptima dentro de un fotobiorreactor, sugieren la combinación de la luz emitida por lámparas fluorescentes y LED's, porque propician las condiciones necesarias para que las microalgas puedan realizar sus funciones metabólicas necesitan en promedio 2500 lx de manera homogénea en el sistema. (González, et al, 2014, pp. 29)

#### 1.4.1.2 Suministro de dióxido de carbono y eliminación de oxígeno

El dióxido de carbono es la fuente de carbono para las algas fotoautótrofas, antes de poder ser empleado, debe disolverse en agua. El  $\text{CO}_2$  predominantemente existe como gas a  $\text{pH} < 6$ ,  $\text{HCO}_3^-$  entre  $\text{pH} 6-10$  y  $\text{CO}_3^{2-}$  a  $\text{pH} > 10$ . En presencia de luz solar, el  $\text{CO}_2$  absorbido se convierte en glucosa durante la etapa de limitación de la tasa de fotosíntesis. La fotorespiración o alto nivel de oxígeno disuelto puede inhibir la formación de biomasa de alrededor del 50%. Sin embargo, la fotorespiración no puede detenerse completamente porque los cultivos de algas pueden alcanzar concentraciones de  $\text{O}_2$  disueltas de 40 ppm, por lo tanto, se requiere un patrón de burbujeo y mezcla eficiente para aumentar la concentración de  $\text{CO}_2$  disuelto en el reactor con el fin de aumentar la absorción de  $\text{CO}_2$  por las células de algas. Cabe indicar que el aumento de la concentración de  $\text{CO}_2$  reduce el pH del cultivo, pudiendo perjudicar el crecimiento algal, la

cantidad apropiada de suministro de CO<sub>2</sub> (1-5%) para el crecimiento de cultivos de alta producción, se pueden inyectar pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> puro. (Debabrata, 2015 pp. 108)

#### *1.4.1.3 Mezclado*

La mezcla asegura un crecimiento homogéneo en todas las áreas del reactor, se relaciona con la transferencia de gas e incluye el equilibrio de temperatura entre las zonas calientes y frías, aumenta la exposición de las células a la luz, permite la transferencia de masa entre los nutrientes y las células. Para asegurar una mayor bioproduktividad es esencial la mezcla vigorosa y la densidad de las algas. Debe considerarse que cuando la biomasa de algas es densa, la penetración de la luz se reduce a 2 - 5 cm. Las burbujas de gas más pequeñas conducen a una mezcla más eficiente y menos turbulenta. (Mokebo, 2012 pp. 43-44)

Un aspecto a tomar en cuenta es la fragilidad de las microalgas, usualmente limita la intensidad de mezclado en el cultivo, las características fotosintéticas y la fragilidad entre otros factores pueden variar dependiendo de la especie en cuestión, en un mismo fotobiorreactor se puede determinar diferentes condiciones de mezclado con el propósito de alterar el régimen de iluminación y con ello la tasa de fotosíntesis. (Flores, et al, 2003, pp.451)

Hay dos formas principales de mezclar biorreactores: uno es mecánico y el otro utiliza la entrada de aire; La mezcla mecánica puede generar cizallamiento debido a altas velocidades del líquido, turbulencia del cultivo y el esfuerzo hidrodinámico inducido. Por otro lado, los sistemas de mezcla de gas causan menos daño de esfuerzo cortante a las células de algas, reduciendo el estrés hidrodinámico y formando buena turbulencia, pero puede generar contaminación biológica que obstruye la transferencia de gas y requiere la limpieza, así como la pérdida de dióxido de carbono a la atmósfera, el daño se puede reducir añadiendo un surfactante no iónico para microalgas si el cizallamiento es frecuente. (Mokebo, 2012 pp. 44)

#### *1.4.1.4 Control de pH y Temperatura*

Uno de los inconvenientes del escalamiento de fotobiorreactores es el cambio de pH, que puede llegar a ser significativo, por ejemplo, en reactores tubulares, el pH al final del tubo tiende a subir, al decrecer la concentración de CO<sub>2</sub> por el consumo de las microalgas, se puede controlar este proceso con la inyección en las zonas donde la concentración ya no permite la capacidad fijadora máxima. (Flores, et al, 2003, pp.450)

Las condiciones adecuadas de temperaturas corresponden a un rango de 18 a 24 °C y el rango propicio de pH varían entre 7.8 y 8.2 en términos generales; esto puede variar de acuerdo a la

especie; en un cultivo convencional de microalgas el pH tiende a aumentar debido al consumo de CO<sub>2</sub> y a la precipitación de algunas sales. (CO<sub>2</sub>ALGAEFIX, 2015, pp. 57).

Un estudio de *C. vulgaris* demuestra que la influencia de la temperatura sobre su viabilidad puede llegar a ser determinante, se trabajó con 4 valores de temperatura (°C): 20, 25, 28, 30 que corresponde a los siguientes % de viabilidad: 93.7±7.0, 74.1±5.5, 41.9±4.1, 20.1, respectivamente; demostrando de esta manera que la tasa de crecimiento se ve afectada por el fuerte aumento de la mortalidad con la temperatura. (Serra, et al, 2016, pp. 356,358)

#### 1.4.1.5 Limpieza

La limpieza asegura el funcionamiento óptimo del sistema, la acumulación de suciedad en los tubos y conectores del reactor puede excluir la luz de las secciones iluminadas del fotobiorreactor e influir en las tasas de crecimiento. La contaminación con patógenos y competidores biológicos es una amenaza potencial para el crecimiento saludable de las algas. Existen diferentes métodos disponibles para la desinfección y esterilización del fotobiorreactor, por ejemplo: lavar con agua una solución de NaOCl al 0,04% y NaOH al 0,2%, emplear tres veces agua desionizada, otra opción es hacer circular una disolución de NaOH al 1% durante 15-20 minutos. (Mokebo, 2012 pp. 47)

### 1.4.2 Parámetros de evaluación de rendimiento de fotobiorreactores

Los rendimientos de diversos fotobiorreactores se evalúan con frecuencia determinando los valores de los parámetros críticos, en base a su productividad por unidad de volumen de reactor, a su productividad por unidad de área ocupada de reactor y según la productividad por área iluminada de reactor, siendo el primer parámetro el más utilizado. (Flores, et al, 2003, pp.450)

#### 1.4.2.1 Productividad volumétrica

La concentración de células por unidad de volumen del reactor por unidad de tiempo. Se calcula a partir de: (Debabrata, 2015 pp. 109):

$$P_x = \frac{(c_f - c_i)}{t}$$

(Ec. 2-1)

Donde:

P<sub>x</sub>= Concentración de células por unidad de volumen (g.L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>)

c<sub>f</sub>= Concentración final (g L<sup>-1</sup>) de biomasa seca

c<sub>i</sub> = Concentración inicial (g L<sup>-1</sup>) de biomasa seca

t = periodo de tiempo.

#### 1.4.2.2 Productividad por Área

$(A_x)$  ( $g\ m^2\ día^{-1}$ ): productividad por unidad de superficie ocupada por unidad de tiempo. Se puede reportar en gramos por metro cuadrado, toneladas por acre, toneladas por hectárea  $gm^{-2}$  (Debabrata, 2015 pp. 109)

#### 1.4.2.3 Tasa de fijación de dióxido de carbono

$F$  ( $g\ L^{-1}\ d^{-1}$ ) puede calcularse a partir de:

$$F = a P_x$$

(Ec. 3-1)

Donde:

$P_x$  = Concentración de células por unidad de volumen ( $g.L^{-1}d^{-1}$ )

$a$  = Dióxido de carbono fijado por unidad de biomasa (considerado 50% de carbono en la biomasa) así, (Debabrata, 2015 pp. 109)

$$a = 0.5 * \frac{44}{12} = 1.833\ g\ CO_2(g\ células\ secas^{-1})$$

(Ec. 4-1)

## CAPÍTULO II

### 2 MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Diseño experimental

##### 2.1.1 Tipo y diseño de investigación

El trabajo de titulación “Diseño y construcción de un prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio para la producción de biomasa algal” empezó siendo de carácter investigativo durante la primera etapa, se recopiló información de los diferentes tipos de fotobiorreactores, sus componentes, ventajas y limitaciones, para escoger el diseño más adecuado.

Posteriormente, el trabajo de titulación se convirtió en un estudio de carácter técnico, de tal manera que se planteó un prototipo de fotobiorreactor hexagonal, con 6 cilindros distribuidos cerca de sus vértices. De acuerdo a la literatura revisada existe un número muy limitado de diseños de fotobiorreactores con esta geometría a pesar de las ventajas que representa para el aprovechamiento de la luz incidente y su relativa facilidad para su construcción.

##### 2.1.2 Unidad de Análisis

La unidad de análisis hace referencia al prototipo, las variables control y a los usos potenciales que implica, se lo dejó instalado en el laboratorio de Biotecnología, los beneficiarios directos son los estudiantes de los últimos semestres de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; quienes estén cursando asignaturas a partir de séptimo semestre de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental, quienes utilizarán el equipo como complemento práctico en su formación profesional.

##### 2.1.3 Población de Estudio

La población de estudio corresponde al prototipo de fotobiorreactor con sus 6 unidades de muestreo al cabo de 3 semanas de control, con un volumen total de 2.5 L por cada unidad. De igual manera, a los beneficiarios de la incorporación del equipo, los estudiantes de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, que tengan conocimientos teóricos de las asignaturas de tratamiento de aguas, biotecnología, microbiología, toxicología

ambiental y no hayan tenido la oportunidad de trabajar con fotobiorreactores ni microalgas a nivel laboratorio.

#### 2.1.4 *Tamaño de Muestra*

El tamaño de la muestra de los potenciales beneficiarios correspondió a 62 estudiantes de los semestres superiores de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH, que cursaban la asignatura de tratamiento de aguas residuales.

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + N * Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

(Ec. 5-2)

$$n = \frac{800 * 1.96^2 * 0.05 * 0.95}{0.0247^2 * (800 - 1) + 1.96^2 * 0.05 * 0.95}$$

$$n = 29$$

Donde:

$$Z_{\alpha}^2 = 1.96^2 \text{ (Si la seguridad es del 95\%)}$$

$$p = \text{Proporción esperada (5\%=0.005)}$$

$$q = 1-p \text{ (1-0.05=0.95)}$$

$$d = \text{Precisión} = 0.247\% = 0.0247$$

$$N = \text{Total de la población}$$

#### 2.1.5 *Selección de muestra*

La selección de la muestra fue de 29 estudiantes de noveno nivel de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH quienes recibieron una charla explicativa sobre microalgas y los géneros más importantes en el área de la Biotecnología Ambiental, fotobiorreactores, condiciones de cultivo a nivel laboratorio; a su vez que realizaron una práctica en los laboratorios de análisis instrumental y calidad ambiental de la Facultad de Ciencias que les permitió adquirir destrezas para la inoculación, control de temperatura, intensidad lumínica, crecimiento algal, ajuste de pH para un rango óptimo de crecimiento.

## **2.2 Metodología**

### **2.2.1 Localización de la experimentación**

El lugar apropiado para la parte experimental debía ser un laboratorio que cuente con: pH-metro, espectrofotómetro UV-Vis, espectrofotómetro de infrarrojo, ultracongelador, liofilizador, balanzas analítica, centrífuga, refrigeradora; además de acceso a agua destilada, tomacorrientes de 110 V y 220 V, materiales de vidrio.

### **2.2.2 Adecuación del lugar**

Las microalgas requieren de nutrientes, CO<sub>2</sub> y luz; por lo que se buscó un lugar apropiado para mantener microalgas, un laboratorio con acceso a tomacorrientes de 110 V y 220 V, que permita la colocación de una repisa con lámparas fluorescentes distribuidas una frente a otra, en el lugar debía existir acceso a frascos de vidrio y plástico estériles de al menos 250 mL, cuyo contenido esté en agitación permanente y tengan un flujo de aire en su interior, que a su vez debían contener las microalgas y un medio de cultivo apropiado para su crecimiento. En lo posible debía estar en un área con baja concurrencia, para evitar la contaminación de los cultivos.

### **2.2.3 Obtención de las microalgas**

Se realizó un estudio preliminar de los lugares donde se trabaja con microalgas y fotobiorreactores en Ecuador, especialmente se consideraron las universidades e institutos que llevan a cabo proyectos de investigación y tengan la posibilidad de compartir su experiencia, posteriormente se realizó una visita in situ para establecer los contactos necesarios, para contar con las facilidades de acceso a los laboratorios y responsables de proyectos. Se buscaron capacitaciones en el área y se gestionó un curso para estudiantes de la Facultad de Ciencias en la ESPOCH.

### **2.2.4 Mantenimiento de las microalgas**

- Preparación de medio de cultivo nitrofoska foliar al 5 % (m/v) en 6 matraces Erlenmeyer de 250 mL
- Determinación de pH en cada Erlenmeyer
- Ajuste de pH con HCl 2.0 N e NaOH 20 % (m/v) (rango 7.5 a 8.5)
- Esterilización de material a 120 °C, 15 psi, 30 minutos: 2 pipetas, 6 difusores, la manguera y los 6 matraces con sus tapones
- Etiquetado de material
- Inoculación de 5mL de *C. vulgaris* en 3 matraces
- Inoculación de 5mL de *Scenedesmus* en 3 matraces

Diariamente se agitó manualmente los matraces para evitar la sedimentación de las microalgas, que estaban expuestas a lámparas fluorescentes en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, se utilizó una pipeta Pasteur para la inyección de aire dentro de los matraces.

### **2.2.5 *Diseño del prototipo de fotobiorreactor***

Posterior a una amplia revisión bibliográfica se decidió diseñar un fotobiorreactor hexagonal con 6 unidades en forma de tubos cilíndricos, se tomó en cuenta parámetros como volúmenes, geometría, tipo materiales y sus usos potenciales.

#### **2.2.5.1 *Selección del volumen para el dimensionamiento***

Con la finalidad de que el equipo sea de uso académico, se determinó un volumen apropiado (15 L) para el control de variables y para el espacio físico disponible en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias- ESPOCH, razones por las que éste no debía ser muy alto o ancho a causa de su limpieza y mantenimiento.

$$V_c = \frac{V_T}{N}$$

(Ec. 6-2)

Donde:

$V_c$  = Volumen del cilindro utilizado con medio de cultivo y microalgas.

$V_T$  = volumen total.

$N$  = Número de cilindros.

#### **2.2.5.2 *Cálculo de alturas y diámetros de los tubos***

La altura del equipo fue determinada en función del volumen total que contienen los cilindros.

$$V'_c = \pi r^2 h'$$

(Ec. 7-2)

Donde :

$V'_c$  = volumen del cilindro.

$r$  = radio del cilindro.

$h'$  = altura del cilindro.

Para determinar la altura ocupada por el medio de cultivo y las microalgas dentro de los cilindros:

$$h = \frac{V_c}{\pi r^2}$$

(Ec. 8-2)

Donde:

h = altura ocupada con medio de cultivo y microalgas

$V_c$  = Volumen del cilindro utilizado con medio de cultivo y microalgas

r = radio del cilindro

Para determinar la altura libre dentro de los cilindros:

$$\text{Altura libre} = h' - h$$

(Ec. 9-2)

Donde:

h' = altura del cilindro

h = altura ocupada con medio de cultivo y microalgas

### 2.2.5.3 Caudal de aire

El control del flujo de aire es importante mantener una inyección constante de dióxido de carbono en el sistema, mantener una mezcla, evitando la sedimentación de las microalgas; se determinó con la ayuda de un anemómetro Brunton y un calibrador pie de rey.

$$Q = v \pi r^2$$

(Ec. 10-2)

Donde:

Q = caudal

v = velocidad

r = radio

Caudal de Dióxido de carbono diario empleado en el prototipo

$$Q_{CO_2} = Q * \% CO_2 \text{ en el aire}$$

(Ec. 11-2)

Donde:

$Q_{CO_2}$  = caudal de dióxido de carbono

Q = caudal

### ***2.2.6 Geometría del fotobiorreactor***

La geometría del fotobiorreactor se estableció considerando la literatura actual, en especial tomando en cuenta las sugerencias para el diseño y construcción de nuevos equipos en este campo

### ***2.2.7 Selección de materiales***

Los materiales escogidos se basaron en una búsqueda en la localidad, se compararon costos y mano de obra.

### ***2.2.8 Construcción del prototipo de fotobiorreactor.***

Se lo realizó con base en el diseño para trabajar con tubos de acrílico, de esta manera realizar un análisis simultáneos bajo las mismas condiciones de temperatura, iluminación y mezclado.

### ***2.2.9 Costos de construcción del prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio.***

Se buscaron tiendas comerciales que oferten los materiales escogidos para la construcción comparando tiempos de vida útil y precios; fue necesaria la visita a diferentes talleres que brinden servicios de corte de láminas de acrílico, ensamblaje de materiales, construcción de equipos de aluminio y vidrio.

### ***2.2.10 Pruebas experimentales del prototipo de fotobiorreactor***

El equipo fue trasladado al Laboratorio calidad del Aire de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, donde se desarrollaron varios ensayos experimentales en condiciones de operación discontinuas.

#### ***2.2.10.1 Medición de la intensidad lumínica dentro de los cilindros***

##### ***2.2.10.1.1 Materiales***

Los materiales empleados para la determinación de la intensidad lumínica dentro de los cilindros fueron:

- Sensor-Unit Weather Cobra 4 Weather marca Phywe, que mide: luminosidad (lx), presión (hPa), temperatura (°C), humedad relativa (% HR), Altura (m)
- Cuaderno de anotaciones
- Flexómetro

#### 2.2.10.1.2 Procedimiento

Se realizan tres mediciones de luminosidad a diferentes alturas en el interior del cilindro con el equipo multiparámetros (sensor-Unit Weather Cobra 4 Weather), la suma de los tres valores se divide por 3, con estos valores promedio de los 6 cilindros se calcula un valor promedio global, que fue convertido a unidades de medida más adecuado para el trabajo en fotobiorreactores con la ayuda de los factores de conversión expuestos en la tabla 5-1.

#### 2.2.10.2 Inoculación de las microalgas

##### 2.2.10.2.1 Materiales

- Inóculo de las microalgas
- Pipetas de 1 y 10 mL
- Agua destilada
- Toallas absorbentes
- Papel aluminio
- Cinta masqui
- Marcador indeleble
- Mascarilla
- Par de guantes
- Gasas

##### 2.2.10.2.2 Procedimiento

Se buscaron medios de cultivo apropiados para el crecimiento de microalgas, se escogió y preparó el medio BG11 con el uso de sales y reactivos correspondientes, utilizando agua destilada y materiales esterilizados. Se prepararon 3 soluciones madre en una cámara de flujo laminar, que fueron almacenadas en condiciones de oscuridad en el laboratorio de Biotecnología para su posterior uso, generalmente la inoculación de las cepas fluctúa entre un 5 y 10% del volumen de producción, para este trabajo se escogió la inoculación del 10% del volumen del medio de cultivo.

Se numeraron los cilindros, del 1 al 3 corresponden a los cultivos de *Chorella*, mientras que del 4 al 5 corresponden a los cultivos de *Scenedesmus*. Para el primer lote, se realizó un experimento preliminar, donde se propuso la variación de la concentración de  $\text{NaNO}_3$ , de esta manera se pudo escoger la composición más apropiada para el segundo lote de producción.

### *2.2.10.3 Control de pH, T interna, y densidad algal, determinación de grupos funcionales al final del proceso.*

#### *2.2.10.3.1 Materiales*

- Termómetro digital All France Max-Min digital -50 a 70 °C
- Cuaderno de anotaciones
- Piseta con agua destilada
- Mandil
- pH-metro
- Mascarilla
- Par de guantes
- Espectrofotómetro UV UV HELIOS β V.60
- Celda de cuarzo
- Espectrofotómetro de Infrarrojo Jasco ir-ft 3200

#### *2.2.10.3.2 Procedimiento*

Los controles se llevaron a cabo de lunes a viernes; el primer lote de cultivo fue entre el 15 de enero al 11 de febrero de 2016; el segundo lote corresponde a al periodo 18 de febrero – 10 de marzo de 2016.

Para el control de la temperatura, se colocó el termómetro digital en la parte superior del equipo. Se introduce la sonda al interior del medio de cultivo y se anota el valor en °C, para realizar la medición en el interior de otro cilindro, se lava y se seca la sonda, de repite este procedimiento con los 6 cilindros y se reporta el valor promedio.

Para la medición del pH, se tuvo la precaución de calibrar el pH-metro con 2 soluciones buffer antes de su uso, para el primer punto de calibración, se introduce electrodo en la primera solución buffer hasta que el pH-metro indique que se ha reconocido el valor, posteriormente se enjuaga el electrodo con agua destilada, se seca y calibra con la segunda solución buffer. Con mucho cuidado se introduce el electrodo al cilindro 1, se espera que el valor se estabilice, se añade una solución ácida o básica según corresponda para ajustar el pH a un rango de 7.5-8.5, la solución ácida empleada fue HCl 2.0 N y la solución básica correspondió a NaOH 20 % (m/v).

Para determinar el crecimiento de las microalgas se registró la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro UV UV HELIOS β V.60 de lunes a viernes a las 5:00 pm, con un rango de error de 1 hora. Las muestras se recolectaron en tubos falcon de 50 mL rotulados, con la ayuda de las llaves de paso que tiene cada cilindro, se homogenizaron las muestras antes de su medición;

se llena la celda de cuarzo con agua destilada para así encerrar el espectrofotómetro y se procede a llenar la celda con cada muestra y medir la absorbancia; estos valores permitieron encontrar la concentración de microalgas [ $\times 10^4$  células/mL] utilizando la siguiente ecuación que nos permitió determinar el número de microalgas por mililitro.

$$\text{Concentración (x104 células/mL)} = 5209.4 \times \text{Abs} - 70.679$$

(Ec. 12-3)

Esta ecuación es el resultado de una curva de calibración elaborada por los investigadores del laboratorio de biología, de la PUCE-SI, con un  $R^2=0.98$ .

Adicional a ello, al finalizar el segundo lote, se colocaron las muestras en el equipo de medición de Infrarrojo para determinar los grupos funcionales más representativos presentes en las muestras, para ello, previo al análisis de las muestras en el Espectrofotómetro de Infrarrojo por transformada de Fourier, se limpió el cristal del ATR de Seleniuro de Zinc empleando alcohol antiséptico, seguidamente se realizó la eliminación de fondo sin la existencia de muestra.

#### 2.2.10.4 Cosecha de microalgas

##### 2.2.10.4.1 Materiales

- Recipientes de 20 L
- Balanza analítica
- 14 tubos falcon
- Centrífuga Garver 224
- Vasos de precipitación de 250 mL
- Pipetas de 10 mL
- Ultracongelador Arctiko Uluf 450
- Liofilizador Thermo Mycro Modulyo

##### 2.2.10.4.2 Procedimiento

Posterior al cultivo, se vuelve necesario separar el componente líquido de la biomasa algal, al cabo de 3 semana de cultivo, según la literatura se la fase exponencial está terminando y la fase estacionaria está empezando, es el momento ideal para su cosecha; los cilindros fueron retirados cuidadosamente del equipo y su contenido con *C. vulgaris* fue colocados en un recipiente de 20 L, etiquetado previamente; el contenido de los cilindros de *Scenedesmus* fue colocado en un segundo recipiente, se dejó reposar por 5 días para que las microalgas puedan sedimentar sin el uso de floculantes, posteriormente se retiró el exceso de agua, quedando la superficie de los recipientes con microalgas, que fueron recolectadas y colocadas en tubos falcon de 50 mL para

su posterior centrifugación por 6 minutos a 840 rpm, nuevamente se retiró el sobrenadante para poder colectar únicamente la biomasa algal, se registró el peso de la biomasa húmeda.

Las muestras se colocaron en fundas ziploc de manera extendida a  $-75^{\circ}\text{C}$  en el ultracongelador por 24 horas, de tal manera que se formen láminas delgadas de biomasa, posteriormente se trasladaron las muestras en un cooler para evitar la exposición de las muestras a las condiciones ambientales hacia el laboratorio de productos naturales, donde se retiró la humedad en el liofilizador que opera a condiciones de vacío por 4 horas, con cuidado se retiró las muestras del equipo y se registró el peso de la biomasa seca.

### ***2.2.11 Demanda del prototipo de fotobiorreactor en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental- ESPOCH***

#### *2.2.11.1.1 Materiales*

- Computadoras
- Cuadernos de apuntes
- Registro de asistencia

#### *2.2.11.1.2 Procedimiento*

La demanda del equipo como complemento dentro de la formación de los estudiantes se realizó en función de las encuestas llevadas a cabo antes y después de la práctica de laboratorio a los estudiantes de noveno nivel de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

Se elaboró una técnica de Laboratorio con la información teórica y los pasos necesarios para la realización una práctica de laboratorio que incluya la inoculación de microalgas, evaluación de crecimiento y el establecimiento de condiciones de cultivo en un fotobiorreactor. Se revisaron y valoraron las respuestas dadas de las encuestas realizadas en línea a los estudiantes, con cuestiones vinculadas a la práctica de laboratorio, además se revisaron los informes presentados por los estudiantes. Los datos recogidos sirvieron para corregir y mejorar la documentación desarrolladas, con el fin de facilitar la comprensión de la técnica al momento de realizar las futuras prácticas de laboratorio; además esta información sirvió como una base para establecer el manual del equipo.

## CAPÍTULO III

### 3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1 Análisis y discusión de resultados

##### 3.1.1 Localización de la experimentación

Los diferentes ensayos realizados con el presente trabajo de titulación se llevaron a cabo mayoritariamente en los laboratorios de Análisis Instrumental, Biotecnología, Calidad del Agua, Bromatología, Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ubicada en Panamericana Sur km 1 ½, en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo.



**Figura 4-3** Ubicación de los laboratorios donde se realizó el trabajo de titulación a) Calidad del agua, b) Biotecnología, c) Bromatología, d) Análisis instrumental, e) Productos Naturales

**Fuente:** <https://earth.google.es/>

##### 3.1.2 Adecuación del lugar

Se adecuó en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias una repisa metálica de 4 niveles, con un sistema eléctrico conectado en paralelo, que permitió la incorporación de 16 lámparas fluorescentes colocadas frente a frente, con un espacio intermedio de 35 cm.

Las superficies de los niveles fueron cubiertas con papel aluminio para concentrar la incidencia de luz. Se colocó una bomba de pecera con 2 salidas de aire, cada a su vez una con una llave de 3 salidas de aire, para la inyección de CO<sub>2</sub> a través de aire en los cultivos. Se implementó señalética para en la repisa para diferenciar los sectores de trabajo con *Chlorella* y *Scenedesmus*.

Cabe mencionar que para ralentizar el crecimiento de microalgas, se utilizó agitación manual de manera diaria en lugar de la inyección de CO<sub>2</sub> inducida por la bomba para peceras.



**Figura 5-3:** Adecuación del área de mantenimiento de las microalgas  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

### 3.1.3 Obtención de las microalgas

Las cepas de *C. vulgaris* fueron facilitadas por la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la PUCE-SI de la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura; mientras que las cepas de *Scenedesmus sp* fueron facilitadas por el Departamento de Recursos Hídricos y Ciencias Ambientales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Cuenca, provincia del Azuay. En los 2 casos, las muestras facilitadas tuvieron un volumen de 40 mL, que fueron transportadas en tubos falcon de 50 mL hacia el laboratorio de biotecnología de la ESPOCH; otra Institución de Educación Superior fue visitada fue la Universidad San Francisco de Quito, en los laboratorios de la carrera de Ingeniería Ambiental cuentan con un fotobiorreactor, que permite desarrollar trabajos de investigación con el mismo.

Con el apoyo de la Asociación de estudiantes de la Escuela Ciencias Químicas se desarrolló un curso teórico práctico del 10 al 12 de junio de 2015, dictado por Cândida Shinn Ph.D., enfocado al área de la ecotoxicología acuática con el uso de *C. vulgaris*, que despertó el interés por desarrollar trabajos de investigación con microalgas en la facultad de Ciencias.



**Figura 6-3** Estudiantes de Ingeniería en Biotecnología Ambiental inoculando *C. vulgaris*  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

### 3.1.4 *Mantenimiento de las microalgas*

Las microalgas fueron renovadas cada 3 semanas porque los cultivos alcanzaron un estado de maduración al concluir este periodo, esto se confirmó con la concentración del color verde y la formación de una especie de conglomerados que flotan en el medio de cultivo.

Para llevar a cabo este proceso de renovación, se necesitó una muestra del cultivo, que actuó como inóculo en el medio de cultivo preparado, evitando la contaminación de otras especies presentes en el ambiente.



**Figura 7-3:** Preparación del medio de cultivo nitrofoska foliar al 5 % (m/v) e inoculación de *C. vulgaris* y *Scenedesmus*  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

El mantenimiento actual se basa en el uso una bomba de aire para pecera que posee 2 salidas de aire conectadas a 2 llaves de paso regulables cada una, que a su vez tienen 3 salidas de aire conectadas a difusores tipo bola que genera burbujas pequeñas, evitando la sedimentación e inyectando dióxido de carbono. Se ha procurado que exista uniformidad en el flujo de aire suministrado del medio de cultivo con la regulación de las llaves de paso.



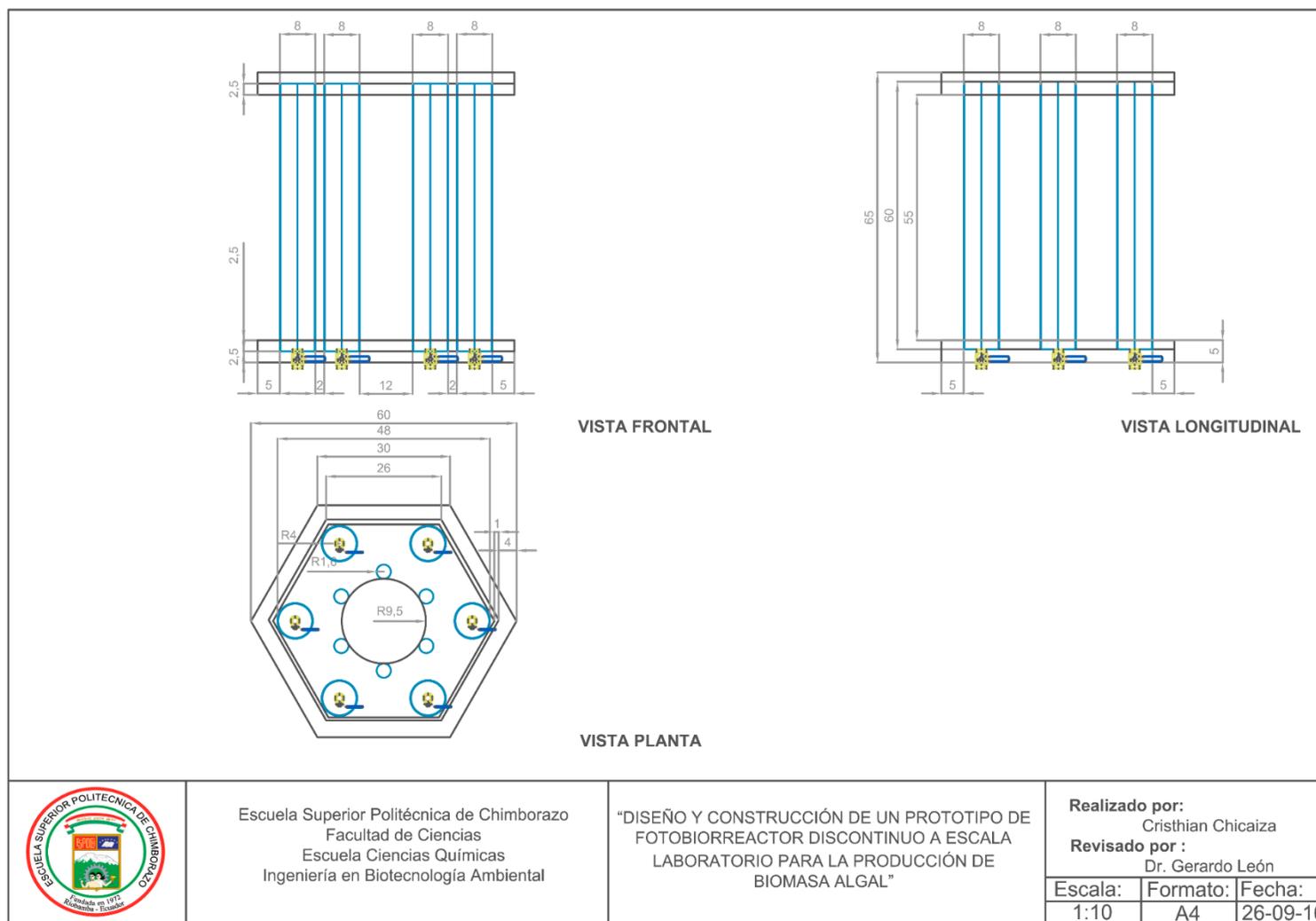
**Figura 8-3:** Mantenimiento de microalgas en el laboratorio de Biotecnología de la ESPOCH  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

### ***3.1.5 Diseño del prototipo de fotobiorreactor***

Se realizó el diseño de prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio, con base hexagonal, con espejos internos que permitan la distribución y concentren la intensidad lumínica en el interior del equipo. En la parte superior se dispuso de un espacio para el armado del sistema eléctrico en paralelo de las lámparas LED, del sistema de aireación, y un termómetro digital, que son permanentes; además de un espacio para un pH-metro.

La forma cilíndrica escogida se debe a que la relación área superficial/volumen frente a los diseños laminares, la distribución de las lámparas y los cilindros de acrílico es de forma hexagonal con el objetivo de realizar una distribución simétrica de la radiación lumínica. Para facilitar su construcción

Se elaboraron los planos de construcción con la ayuda del software AutoCAD 2014, estableciendo la vista frontal, lateral y de planta del prototipo propuesto, se indica además la geometría y dimensiones del fotobiorreactor en la figura 9-3



**Figura 9-3.** Geometría y medidas del prototipo de fotobiorreactor discontinuo.  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

### 3.1.5.1 Selección del volumen para el dimensionamiento

El volumen de todo el equipo corresponde a 15 L, mientras que el volumen de cada cilindro equivale a 2.5 L

$$V_c = \frac{15 L}{6}$$

$$V_c = 2.5 L$$

### 3.1.5.2 Cálculo de alturas y diámetros de los tubos

Considerando que el volumen total equivale a 15 L y el diseño incluye la realización de 6 tubos de acrílico de 8 cm de radio, distribuidos en una base hexagonal, cada tubo debía contener al menos 2.5 L.

$$h = \frac{2500 \text{ cm}^3}{\pi(4\text{cm})^2}$$

$$h = 49.74 \text{ cm}$$

La altura ocupada equivale a 49.74 cm considerando un  $r=4$  cm,  $V_c=2.5L$  y tomando en cuenta que los cilindros no podían estar totalmente llenos porque impediría el control de variables, se consideró mantener una altura de al menos 10 cm libre, por lo que la altura total del cilindro diseñada corresponde a 60 cm, más la altura de las llaves de paso colocadas en la parte inferior.

El volumen del cilindro utilizado con medio de cultivo y microalgas más el espacio vacío para hacer los controles correspondió a 3.02 L

$$V'_c = \pi(4\text{cm})^2(60\text{cm})$$

$$V'_c = 3015.93 \text{ cm}^3$$

$$V'_c = 3.02 L$$

La distancia entre la altura de los cilindros y la altura ocupada en los mismos se determinó con una diferencia de alturas.

$$\text{Altura libre} = 60 \text{ cm} - 49.74 \text{ cm}$$

$$\text{Altura libre} = 10.26 \text{ cm}$$

### 3.1.5.3 Caudal de aire

Se determinó el diámetro de las tuberías de plásticos, con un radio de 0.4 cm, la velocidad del aire suministrada por la bomba equivalió a 2.5 m/s, El caudal de aire corresponde a 125.66 cm<sup>3</sup>/s

$$Q = (250 \text{ cm/s}) (\pi) (0.4 \text{ cm})^2$$

$$Q = 125.66 \text{ cm}^3/\text{s}$$



**Figura 10-3** Medición del flujo de aire con el uso de un anemómetro

Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017

El caudal de aire dióxido de carbono corresponde a 0.38 cm<sup>3</sup>/s

$$Q_{\text{CO}_2} = (125.66 \text{ cm}^3/\text{s}) (0.03/100)$$

$$Q_{\text{CO}_2} = 0.0378 \text{ cm}^3/\text{s}$$

### 3.1.5.4 Geometría del fotobiorreactor

La altura del equipo se limitó a la altura de los cilindros establecida previamente; respecto a la base hexagonal, se consideró que la distancia entre los vértices opuestos fuese de 60 cm, para poder distribuir adecuadamente las lámparas LED, que tienen un ancho de 2.2 cm y los cilindros de diámetro de 8 cm. La longitud de los lados de la base hexagonal correspondió a 30 cm, las lámparas internas tuvieron una separación de 11 cm, mientras que la distancia de un cilindro a otro fue de 20 cm, medidos desde el centro.

En la parte superior del equipo se consideró necesario diseñar unos orificios con un diámetro ligeramente superiores al de los tubos, que sirva como soporte; se diseñaron 6 perforaciones en la base del equipo para que pueda colocarse una llave de paso de 1/4 " por cada cilindro.

### 3.1.5.5 Selección de materiales

Los materiales que se consideraron para la construcción del prototipo fueron: láminas de acrílico transparente (40x80x0.25) cm para los cilindros porque su duración es superior a otros materiales y su facilidad para ser cortados, moldeados y pegados; 2 planchas de madera DMF (60x60x0.30) cm se escogió madera DMF por su facilidad para realizar perforaciones, donde atraviesan las llaves de paso (base) y los cilindros (parte superior); barras cuadradas de aluminio para la estructura del prototipo, por su capacidad anticorrosiva y el tiempo de vida útil que presenta; vidrio tipo espejo, que fue colocado en las paredes con el propósito de concentrar la intensidad lumínica, evitar la contaminación y mantener una temperatura interna constante.



**Figura 11-3.** Materiales utilizados en la construcción del prototipo.

a) Mangueras conectadas a difusores, b) Amoladora, láminas de acrílico (40x80x0.25) m, flexómetro, c) Cable gemelo N° 14, lámparas T5 LED9 W Jhonsunlight, d) Tubos cuadrados de Aluminio de 1 1/4", e) manguera, bomba de aire para pecera, llaves de paso tipo bola 1/4", f) Temporizador, g) Pegamento epóxico h) Termómetro digital All France Max-Min digital -50 a 70 °C

**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

### ***3.1.6 Construcción del prototipo de fotobiorreactor.***

La construcción del equipo implicó trabajar en varios talleres de la ciudad de Ambato: para el moldeado de los tubos se requirió de la asistencia de un taller artesanal que utiliza hornos a altas temperaturas, moldes y fresadoras; el corte de material de acrílico en forma circular para las bases de los cilindros se lo realizó en una imprenta que trabaja con luz láser; para nivelar las alturas de los cilindros de acrílico se recurrió a un taller que trabaja con tornos y fresadoras; la estructura metálica y montaje del equipo fue realizada en un taller de aluminio y vidrio.



**Figura 12-3.** Vista frontal, longitudinal y de planta del prototipo de fotobiorreactor  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

**3.1.7 Costos de construcción del prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio.**

**Tabla 5-3:** Costo de los materiales empleados en la construcción del prototipo de fotobiorreactor.

<b>Unidades</b>	<b>Descripción</b>	<b>Valor individual</b>	<b>Valor Global</b>
6	Llaves de paso tipo bola 1/4"	2.50	15.00
14	Pegamentos epóxicos	5.00	70.00
6	Cable gemelo N° 14 (m)	0.60	3.60
2	Enchufes planos	0.30	0.60
6	Lámparas T5 LED 9 W Jhonsunlight	6.00	36.00
2	Bombas de aire para pecera <i>Power 500</i>	20.00	40.00
10	Maguera para peceras (m)	0.80	8.00
4	Llaves de paso con 3 salidas (para el motor)	6.00	24.00
2	Láminas de acrílico de dimensiones (40x80x0.25) (m)	26.00	52.00
2	Lijas N° 1500	0.50	1.00
1	Sierra SANDFLEX para metal N° 18	1.50	1.50
12	Difusores de aire	2.50	30
1	Temporizador	26.00	26.00
2	Tubos cuadrados de Aluminio de 1 1/4" con aleta U	10.00	20.00
2	Planchas de madera MDF (60x60x0.30) cm	7.00	14.00
6	Vidrios de cristal reflectivos (60x30x0.25) cm	4.00	24.00
2	Juegos de bisagra para vidrio	2.00	4.00
1	Barra de silicona transparente	5.00	5.00
6	Hexagonales de plástico (uniones)	1.25	7.50
6	Anclas de plástico	0.20	1.20
1	Broca para metal de 1/8"	3.00	3.00
2	Teflones industriales	0.60	1.20
1	Estilete mediano	0.60	0.60
Sumatoria			\$388.2

**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

**Tabla 6-3:** Costos de materiales y reactivos de laboratorio para la construcción del prototipo de fotobiorreactor.

<b>Unidades</b>	<b>Descripción</b>	<b>Valor individual</b>	<b>Valor Global</b>
6	Tubos de ensayo (10 mL)	0.6	3.60
1	Probeta 50 mL	8.00	8.00
1	Fertisol 500 g NPK 30:10:10	2.50	2.50
1	Galón de alcohol potable	15.00	15.00
15	Galones de agua destilada	4.00	60
1	Microespátula 150 mm	7.5	7.5
1	Termómetro All France Max-Min digital -50 a 70 °C	33.60	33.60
1	Sulfato de cobre pentahidratado (500 g)	3.00	3.00
1	Cloruro de Calcio (500 g)	4.00	4.00
1	Ácido cítrico (500 g)	1.80	1.80
1	Óxido férrico (10 g)	3.50	3.50
1	Cloruro de Manganeso (10 g)	6.5	6.5
2	Baldes con llave (20 L)	12.00	24.00
10	Frascos para muestras de orina	0.50	5.00
30	Pares de guantes estériles	0.25	7.50
12	Gasas	0.30	3.60
1	Algodón	3.00	3.00
6	Cofias	0.50	3.00
6	Mascarillas	0.30	1.80
2	Taipes	0.50	1.00
1	Tijera	0.60	0.60
1	Piseta 250 mL	5.00	5.00
1	Kit de lámparas halógenas	6.20	6.20
2	Láminas de papel filtro	0.50	1.00
1	Pack de 20 unidades tubos Falcon de 50 mL + envío	27.00	27.00
Sumatoria			\$237.70

Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017

**Tabla 7-3:** Costos adicionales de servicios adicionales a la construcción del prototipo de fotobiorreactor.

Descripción	Valor
Moldeado en forma circular a las láminas de acrílico	50.00
Torneado e igualado de la altitud de los cilindros de acrílico	30.00
Transporte	120.00
Impresiones y copias	50.00
Recorte en forma circular a láser	27.00
Ayuda para el ensamblado de la estructura de Aluminio	30.00
Sumatoria	\$307.00

**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

Los valores expuestos en las tablas 5-3, 6-3 y 7-3 indican los costos que representaron la construcción del prototipo de fotobiorreactor, materiales y reactivos de laboratorio, gastos de servicios adicionales respectivamente, que representan una sumatoria total de \$ 932.9.

### 3.1.8 Pruebas experimentales del prototipo de fotobiorreactor

#### 3.1.8.1 Medición de la intensidad lumínica dentro de los cilindros

**Tabla 8-3:** Datos obtenidos de las mediciones de intensidad lumínica en el interior de los cilindros

Número de cilindro	Medición (lx)	Promedio (lx)	Promedio ( $\mu$ mol fotón $m^{-2} s^{-1}$ )
1	759.70	757.48	10.24
	756.60		
	756.15		
2	795.20	801.12	10.83
	809.40		
	798.75		
3	976.25	985.72	13.32
	986.90		
	994.00		
4	873.30	866.20	11.71
	866.20		
	859.10		
5	773.90	766.58	10.36
	766.80		
	759.05		
6	874.20	874.35	11.82
	844.90		
	883.95		

**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017



**Figura 13-3:** Medición de la intensidad lumínica utilizando un Sensor-Unit Weather Cobra 4 Weather, de marca Phywe  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

El valor promedio de intensidad lumínica medido al interior de los 6 cilindros equivale a 841,91 lx, que puede expresarse también como  $11,38 \mu \text{ mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

### 3.1.8.2 *Inoculación de las microalgas*

Se utilizó el medio BG11 para el cultivo de las microalgas, las cantidades de los componentes empleados fueron los sugeridos en la tabla 1-1, con una modificación en la concentración de  $\text{NaNO}_3$ , como se expone en la tabla 9-3.

Se utilizó como inóculo el 10% del volumen del cilindro, es decir por cada tubo de volumen operable correspondiente a 2.5L, se utilizó 250mL de cultivo con microalgas frescas, preparadas en el mantenimiento.



**Figura 14-3.** Preparación de medio de cultivo BG11 en una cámara de flujo laminar.  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

**Tabla 9-3:** Experimento preliminar, primer lote de microalgas, modificación de la solución madre 1 en la concentración de NaNO<sub>3</sub>

Tubo de acrílico	Microalga	NaNO <sub>3</sub> (g/L)
1	<i>C. vulgaris</i>	1.5
2	<i>C. vulgaris</i>	2
3	<i>C. vulgaris</i>	2.5
4	<i>Scenedesmus</i>	1.5
5	<i>Scenedesmus</i>	2
6	<i>Scenedesmus</i>	2.5

**Fuente:** Realizado por Chicaiza, Cristhian, 2017

Pudiendo determinar que la concentración más adecuada para el crecimiento de *C. vulgaris* y *Scenedesmus* es 2 g de NaNO<sub>3</sub>/L, según la tabla 10-3; esta concentración fue la que se utilizó en el segundo lote de producción de microalgas



**Figura 15-3.** Colocación de los cilindros de acrílico con medios BG11 una vez inoculadas las microalgas

**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

### 3.1.8.3 Control de pH, T interna, y densidad algal, determinación de grupos funcionales al final del proceso.

La temperatura registrada para el primer lote se encuentra en la tabla 10-3, cuyo valor promedio equivale a 27.01 °C, mientras que la temperatura global del segundo lote correspondió a 25.87 °C.

El pH fue ajustado a un rango de 7.5-8.5 durante los controles. La absorbancia fue medida a 750 nm en el espectrofotómetro y fue expresada a concentración ( $\times 10^4$  células/mL) utilizando la Ec. 12-3; el resultado de esta conversión se encuentra en las tablas 10-3 y 12-3



**Figura 16-3.** Medición de Absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

**Tabla 10-3:** Primer lote de producción de microalgas; en los cilindros 1, 2 y 3 se cultivó *Chlorella*, en los cilindros 4, 5 y 6 se cultivó *Scenedesmus*

Fecha	Días	Concentración ( $\times 10^4$ células/mL)						Temperatura promedio ( $^{\circ}\text{C}$ )
		Número de cilindro						
		1	2	3	4	5	6	
15/01/16	1	49.14	49.14	49.14	57.82	57.82	57.82	25.9
18/01/16	3	153.33	174.16	200.21	106.44	163.74	54.35	25.7
19/01/16	4	127.28	309.61	455.47	361.70	528.40	637.80	26.6
20/01/16	5	325.24	528.40	564.87	538.82	851.38	590.91	25.8
21/01/16	6	507.56	1007.67	945.15	606.54	1549.44	700.31	26.1
22/01/16	7	502.36	1012.88	356.49	1268.14	2013.08	429.42	25.4
25/01/16	10	1486.93	2273.55	1617.17	2789.28	4034.33	1361.91	25.2
26/01/16	11	1096.23	1877.64	1299.39	2362.11	4518.80	1169.16	26.3
27/01/16	12	919.11	1955.78	726.36	2591.32	4633.41	950.36	25.8
28/01/16	13	1012.88	2731.98	1018.09	3278.97	5612.78	893.06	25.9
29/01/16	14	1210.83	2836.17	773.24	3153.94	5216.86	580.50	26.2
01/02/16	17	1653.63	4404.20	1554.65	4909.51	5289.79	1429.63	25.7
02/02/16	18	1742.19	5268.96	1611.96	4805.32	4148.94	1455.68	25.9
03/02/16	19	1789.08	5373.14	1705.73	4956.39	3497.76	1476.51	25.6
04/02/16	20	1700.52	5732.59	1752.61	4945.97	3049.75	2820.54	25.9
05/02/16	21	2075.59	5982.64	1882.85	5008.49	2513.18	1497.35	26.2
10/02/16	22	2497.56	7399.60	2544.44	5638.82	3904.09	1856.80	25.8
11/02/16	23	2471.51	7446.49	2528.81	5347.10	3825.95	1841.17	25.6

**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

**Tabla 11-3:** Control de pH del primer lote de producción de microalgas; en los cilindros 1, 2 y 3 se cultivó *Chlorella*, en los cilindros 4, 5 y 6 se cultivó *Scenedesmus*

Fecha	pH											
	Número de cilindro											
	1		2		3		4		5		6	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
15/01/16	8.18	7.59	8.18	7.65	8.18	7.98	8.06	7.94	8.04	7.66	8.04	7.89
18/01/16	8.28	7.78	7.72	7.72	8.68	7.52	8.22	7.86	7.56	7.56	8.06	7.64
19/01/16	8.33	7.52	8.84	7.51	8.46	7.62	9.12	7.67	9.96	7.80	8.50	7.59
20/01/16	8.87	7.77	8.55	7.61	10.16	7.17	8.88	7.75	10.22	7.37	9.04	7.26
21/01/16	9.41	7.65	10.51	7.51	8.72	7.63	10.84	7.60	9.65	7.53	10.52	7.51
22/01/16	10.11	7.66	9.88	7.50	8.81	7.72	8.77	7.73	11.69	7.54	10.51	7.76
25/01/16	8.64	7.63	10.62	7.89	8.54	7.65	9.09	7.51	10.26	7.55	10.64	7.51
26/01/16	9.98	7.64	8.22	7.93	8.44	7.62	11.28	7.84	9.76	7.71	9.46	7.62
27/01/16	10.61	7.80	9.11	7.97	10.05	7.56	10.61	7.60	11.24	7.73	8.01	7.90
28/01/16	10.44	7.43	9.10	7.53	9.58	7.57	9.81	7.55	10.33	7.61	8.38	7.82
29/01/16	10.22	7.75	8.72	7.92	7.86	7.96	9.94	7.78	9.13	7.63	8.07	7.59
01/02/16	11.37	7.55	10.30	7.99	11.83	7.88	11.92	7.65	11.85	7.89	11.73	7.55
02/02/16	9.67	7.95	10.37	7.92	10.52	7.72	11.29	7.54	11.38	7.92	10.48	7.65
03/02/16	9.47	7.60	9.86	7.66	9.76	7.88	7.10	7.95	8.15	7.76	8.39	7.72
04/02/16	9.04	7.55	9.89	7.65	9.02	7.84	10.11	7.89	10.61	7.98	9.87	7.83
05/02/16	10.42	7.89	9.68	7.66	8.97	7.54	8.88	7.64	10.92	7.89	10.13	7.65
10/02/16	10.47	7.68	9.47	7.77	10.17	7.87	10.24	7.67	11.04	8.04	9.04	8.01
11/02/16	10.58	8.04	9.78	7.45	10.01	8.04	9.74	7.68	9.78	7.81	9.31	8.02

Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017

**Tabla 12-3:** Segundo lote de producción de microalgas; en los cilindros 1, 2 y 3 se cultivó *Chlorella*, en los cilindros 4, 5 y 6 se cultivó *Scenedesmus*

Fecha	Días	Concentración ( $\times 10^4$ células/mL)						Temperatura promedio (°C)
		Número de cilindro						
		1	2	3	4	5	6	
18/02/16	1	1445.26	1445.26	1445.26	1278.56	1278.56	1278.56	26.6
19/02/16	2	1981.82	1643.21	1934.94	1700.52	1684.89	1955.78	26.5
23/02/16	5	3372.73	4430.24	3945.77	3362.32	2283.97	2721.56	25.8
24/02/16	6	3591.53	4326.05	4013.49	3445.67	2804.91	2487.14	26.2
25/02/16	7	4524.01	4539.64	3971.82	4383.36	4289.59	2700.72	25.8
26/02/16	8	4487.55	4461.50	3560.27	4206.24	1778.66	2211.04	26.3
01/03/16	12	6555.68	4727.18	3747.81	5196.02	2226.67	3206.03	29.0
02/03/16	13	1653.63	4404.20	1554.65	4909.51	5289.79	1429.63	28.6
03/03/16	14	1096.23	1877.64	1299.39	2362.11	4518.80	1169.16	26.8
04/03/16	15	919.11	1955.78	726.36	2591.32	4633.41	950.36	27.2
05/03/16	16	1012.88	2731.98	1018.09	3278.97	5612.78	893.06	28.3
08/03/16	19	1210.83	2836.17	773.24	3153.94	5216.86	580.50	27.6
09/03/16	20	1653.63	4404.20	1554.65	4909.51	5289.79	1429.63	26.9
10/03/16	21	1742.19	5268.96	1611.96	4805.32	4148.94	1455.68	27.5

Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017

**Tabla 13-3:** Control de pH del segundo lote de producción de microalgas; en los cilindros 1, 2 y 3 se cultivó *Chlorella*, en los cilindros 4, 5 y 6 se cultivó *Scenedesmus*

Fecha	pH											
	Número de cilindro											
	1		2		3		4		5		6	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
18/02/16	9.15	8.04	9.15	7.62	9.15	7.56	7.86	7.65	7.86	7.72	7.86	7.55
19/02/16	11.37	8.30	11.20	8.42	8.31	8.31	8.01	8.01	8.08	8.08	7.68	7.68
23/02/16	10.79	8.06	10.24	8.12	9.93	8.08	10.39	8.84	11.66	8.34	11.72	8.41
24/02/16	10.65	8.10	11.76	8.25	11.87	8.35	10.55	8.37	10.75	8.23	10.41	8.44
25/02/16	10.98	8.37	10.96	8.32	11.32	8.17	11.37	8.28	11.45	8.24	10.82	8.28
26/02/16	10.97	7.18	10.81	8.11	8.69	8.21	8.00	7.99	9.08	8.37	8.06	8.03
01/03/16	11.08	8.01	11.15	8.19	11.23	8.23	10.01	8.16	11.21	8.19	11.16	8.36
02/03/16	11.68	8.24	11.55	7.56	9.20	8.36	9.72	8.32	11.7	8.30	9.42	8.36
03/03/16	11.58	8.23	10.95	8.25	9.83	8.36	10.94	8.32	10.34	8.45	10.85	8.42
04/03/16	11.08	8.03	10.97	8.05	10.89	7.53	9.72	8.08	11.95	7.55	9.25	7.55
05/03/16	10.98	8.07	9.92	8.31	10.86	8.19	9.82	8.15	7.93	7.56	10.22	7.86
08/03/16	10.96	8.13	10.86	7.79	11.97	8.53	8.14	8.08	12.04	8.10	11.02	8.37
09/03/16	8.75	7.62	9.51	8.36	9.82	8.34	9.36	8.46	9.57	8.27	10.8	8.26
10/03/16	8.74	8.09	8.73	7.65	8.31	8.37	9.26	7.65	9.81	7.92	8.27	8.02

Realizado por: Chicaiza, Cristian, 2017



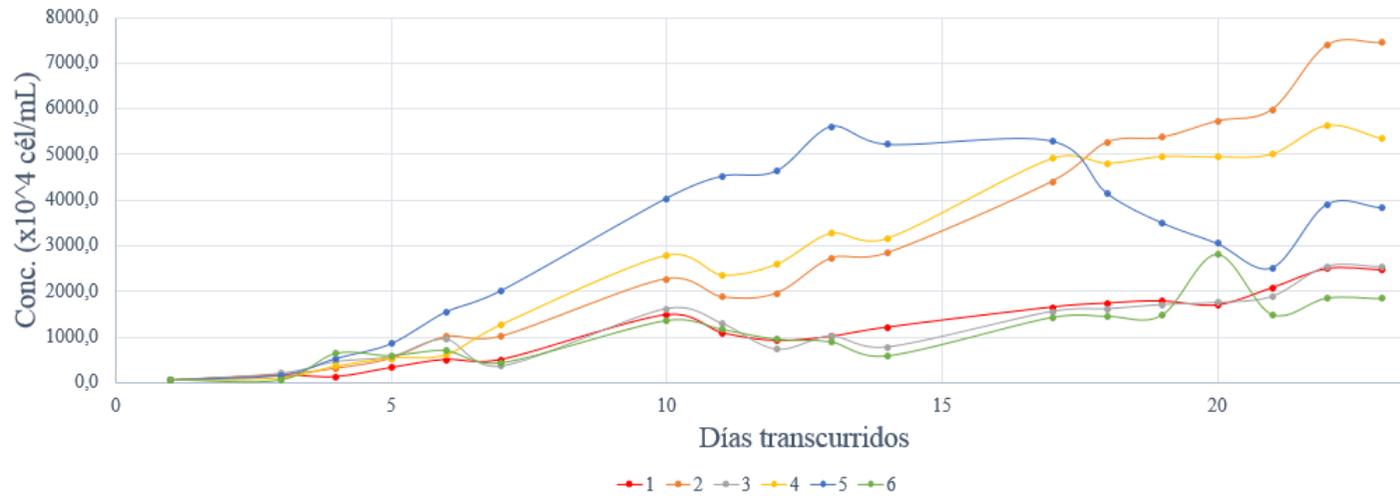
**Figura 17-3.** Limpieza del equipo antes de su uso.

Realizado por: Chicaiza, Cristian, 2017



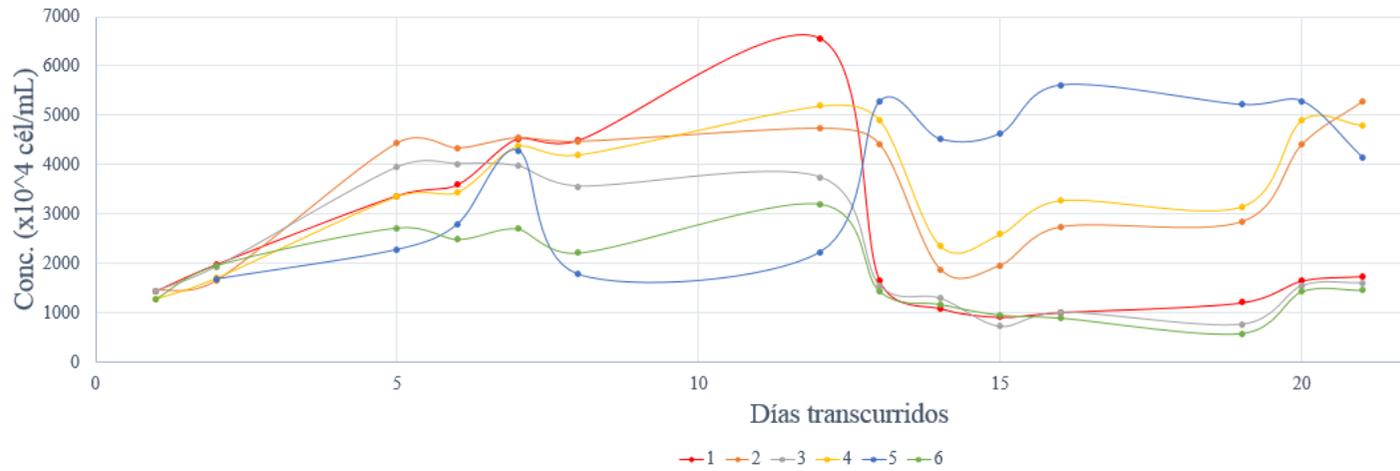
**Figura 18-3.** Puesta en marcha del prototipo

Realizado por: Chicaiza, Cristian, 2017



**Gráfico 1-3.** Primer lote de producción de microalgas.

Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017



**Gráfico 2-3.** Segundo lote de producción de microalgas.

Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017

La gráfica 1-3 presenta los resultados obtenidos de tabla 10-3, que a su vez reúne la producción de microalgas y la variación de la temperatura, cuyo valor promedio es de 27.08 °C, desde el 15 de enero de 2016 hasta el 11 de febrero del mismo año.

El contenido de los cilindros 1, 2 y 3 fue un cultivo de *C. vulgaris*, mientras que en los cilindros 4, 5 y 6 se cultivó *Scenedesmus*, esta diferenciación es muy importante al momento de comparar el comportamiento de las curvas de crecimiento con la consideración de que, en el primer caso *C. vulgaris* se utiliza ampliamente para evaluar el crecimiento en función del tiempo, mientras que *Scenedesmus* se lo utiliza para el análisis de producción de biomasa por su capacidad de adaptación.

Para el primer lote de producción se consideró necesario modificar una variable, la concentración de NaNO<sub>3</sub> con el fin de determinar la dosis más adecuada para una mayor producción, es por ello que las unidades de análisis 1 y 4 tuvieron una concentración de 1.5 g/L de NaNO<sub>3</sub>, la densidad algal alcanzada fue de 2471.51(x10<sup>4</sup> células/mL) y 5347.10 (x10<sup>4</sup> células/mL) respectivamente. Dentro de las unidades de análisis 2 y 5 se tuvo una concentración de 2.0 g/L de NaNO<sub>3</sub> se logró una densidad de 7446.49 (x10<sup>4</sup> células/ mL) y 3825.95 (x10<sup>4</sup> células/ mL) respectivamente; en los cilindros 3 y 6 la concentración de NaNO<sub>3</sub> fue de 2.5 g/L, se alcanzó una densidad de 2528.81 (x10<sup>4</sup> células/ mL) y 1841.17 (x10<sup>4</sup> células/ mL), respectivamente.

El comportamiento de la curva de crecimiento es normal con referencia a la literatura, ya que se puede identificar la fase de latencia desde la inoculación hasta el quinto día, de manera general en se observa la fase exponencial desde el quinto hasta el décimo séptimo día, a partir de este día se observa la fase estacionaria del cultivo, donde la tasa de crecimiento se compensa con la tasa de muerte de las microalgas. El resultado esperado suponía una relación directa entre la concentración de NaNO<sub>3</sub> y la densidad algal final, que no se cumplió en ningún caso.

Para *Chlorella* se encontró que la mayor densidad algal obtenida fue cuando el medio BG11 contenía 2.0 g/L de NaNO<sub>3</sub>, la segunda mayor densidad se obtuvo cuando el medio contenía 2.5 g/L de NaNO<sub>3</sub>. Para *Scenedesmus*, la mayor densidad final fue cuando la concentración de NaNO<sub>3</sub> fue de 1.5 g/L, es necesario indicar que la segunda mayor densidad de *Scenedesmus* correspondió al medio de cultivo BG11 que contenía 2.0 g/L de NaNO<sub>3</sub>; con estos resultados se decidió emplear 2.0 g/L para las siguientes corridas en el equipo.

La gráfica 2-3 muestra los resultados obtenidos de tabla 12-3, contienen a su vez la producción de microalgas y la fluctuación de la temperatura, cuyo valor promedio es de 25.87 °C, desde el 18 de febrero de 16 hasta el 10 de marzo del mismo año; la importancia de la temperatura respecto a la viabilidad como lo demuestra Serra, et al, (16, pp. 356) puede ser determinante, para una temperatura de 25°C el % de viabilidad llega a ser de 41.9±4.1 para *Chlorella*, esta temperatura

se acerca al promedio del segundo lote de producción, por lo que esta variable no fue la más adecuada dentro de la producción para contar con una viabilidad relativamente alta.

El contenido de los cilindros 1, 2 y 3 fue un cultivo de *Chlorella*, mientras que en los cilindros 4, 5 y 6 se cultivó *Scenedesmus*. El comportamiento de la curva de crecimiento es regular hasta el día doce; se puede identificar la fase de latencia los primeros dos días, la fase exponencial hasta el quinto día, a partir de este punto hasta el décimo segundo día se observa la fase estacionaria, posteriormente el comportamiento de la curva muestra la fase de declive o muerte celular en las 6 unidades de análisis, excepto en el cilindro 5, donde el crecimiento es exponencial entre los días 12 y 13, seguidamente su densidad algal no variará mayoritariamente hasta el día 20, donde habrá un ligero descenso hasta el día 21. El comportamiento en los cinco cilindros restantes puede explicarse también por el consumo de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, otra observación importante es la tendencia a sedimentar en los tubos de acrílico al ser insuficiente la inyección de aire al sistema, por lo que se tuvo 2 fases diferenciadas: una sedimentable y una sección de considerable proporción en constante movimiento.

La mayor densidad algal que se obtiene al cabo de las 3 semanas para *Chlorella* es en la unidad 2, mientras que la densidad máxima para *Scenedesmus* se presenta en el cilindro 4.

#### 3.1.8.4 Cosecha de microalgas

El producto del primer lote fue colocado en dos recipientes de 20 L, se puso el contenido de los 3 primeros cilindros de *Chlorella* en un recipiente y los 3 restantes cilindros de *Scenedesmus* en otro contenedor, de esta manera los productos fueron sedimentado por 5 días sin utilizar ningún tipo de floculante y la biomasa húmeda fue centrifugada a 840 rpm por 6 minutos, se desechó el sobrenadante y se guardó en refrigeración. Este cultivo cumplió el propósito de encontrar las condiciones óptimas de crecimiento en el equipo y concentraciones de la solución madre 1 del medio de cultivo BG11.

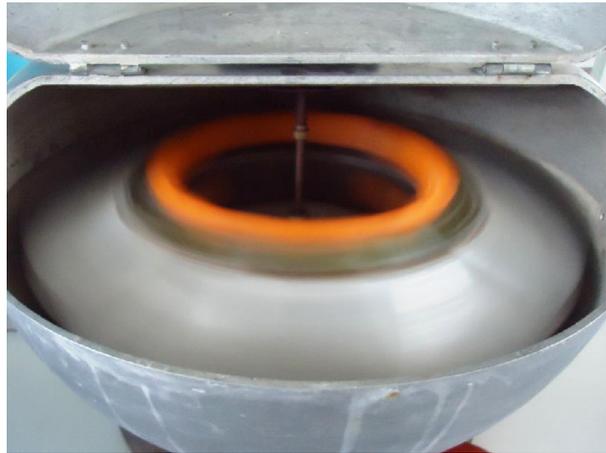


**Figura 19-3.** Sedimentación de las microalgas al cabo de 4 días:  
a) *Scenedesmus* b) *Chlorella*

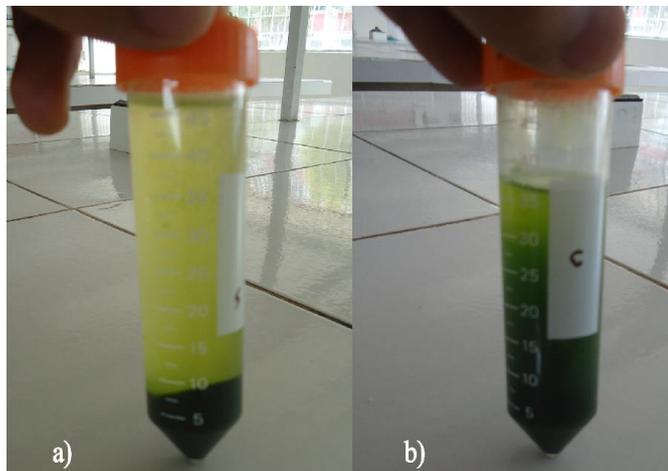
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017



**Figura 20-3.** Biomasa húmeda recolectada: a) *Scenedesmus* b) *Chlorella*  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017



**Figura 21-3.** Centrifugación de las muestras de biomasa algal.  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017



**Figura 22-3.** Biomasa húmeda centrifugada a 840 rpm por 6 minutos: a) *Scenedesmus* b) *Chlorella*  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

El producto del segundo lote en el prototipo de fotobiorreactor tuvo el mismo tratamiento, posterior a la centrifugación se obtuvo: 71.59 g de *Scenedesmus* y 44.58 g de *Chlorella*

correspondiente a biomasa húmeda, lo que representa que se obtuvo 1.61 veces más de biomasa húmeda de *Scenedesmus* frente a *Chlorella*.



**Figura 23-3.** Separación del sobrenadante de la biomasa algal.

**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

Posterior a la liofilización de las muestras por 4 horas seguidas, se determinó la cantidad de biomasa seca que correspondió a 6.59 g y 9.74 g para *Chlorella* y *Scenedesmus*, respectivamente; existió una relación de 1.48 veces más de *Scenedesmus* de biomasa seca frente a *Chlorella*, proporción que es aproximadamente igual a la relación de biomasa húmeda entre las 2 especies, lo que permite afirmar que la producción de *Scenedesmus* bajo las mismas condiciones de cultivo es superior en aproximadamente 1.5 veces más frente a *Chlorella* en el prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio al cabo de 3 semanas, esta consideración es muy importante para cultivos posteriores, porque tenemos un referente de producción.

El volumen final de los cilindros se vio afectado por la recolección de muestras para la medición en el espectrofotómetro, se requirió aproximadamente 25 mL por cada una que no fue devuelta a los tubos, al tener 14 muestreos, el volumen utilizado fue de 350 mL por cilindro, que multiplicado por los 3 cilindros de cada especie, se tiene una pérdida de volumen de 1.05 L, valor que fue restado del volumen del cilindro utilizado con medio de cultivo y microalgas que equivalió a 7.5 L, obteniendo de esta manera un volumen final de 6.45 L por cada especie de microalga.

Se estableció una relación de la biomasa seca con el volumen de cultivo:

Para *C. vulgaris* se tuvo 6.59 g cultivados en 6.45 L, se obtiene una producción de 1.02 g/L, que al permanecer 21 días, su tasa de crecimiento en este periodo correspondió a 48.65 mg/L.d<sup>-1</sup>. Para el cultivo de *Scenedesmus* se obtuvo 9.78 g cultivados en 6.45 L, se obtuvo 1.52 g/L de producción en 21 días, con una tasa de producción de 72.20 mg/L.d<sup>-1</sup>.

Estos valores pueden contrastarse con otros como los de otras investigaciones, por ejemplo, en la Universidad Nacional Cheng Kung (NCKU), se examinó el efecto de la concentración de

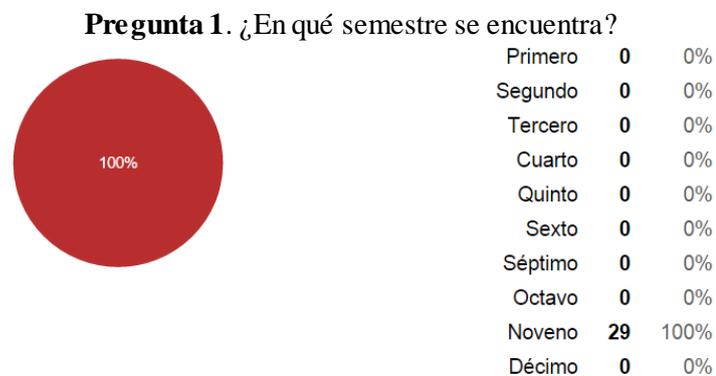
nitrógeno sobre el crecimiento celular de FSP-E de *C. vulgaris* en cultivos al aire libre con diferentes concentraciones iniciales de urea, el crecimiento en 9.3 y 12.4 mM de urea dio como resultado una concentración de biomasa 2.48 y 3.11 g/L (Chun, et al, 2015, pp. 266) tras varios procesos de optimización en su producción, que difieren aproximadamente en 1.6 y 2.05 veces sobre al valor máximo obtenido de biomasa seca respecto al volumen utilizado del cultivo realizado en la ESPOCH, considerando además que Flores et al, (2003, pp.450) afirma que los cultivos de algas de Alta Densidad Celular (ADC) implican concentraciones celulares mayores a 3g/L de biomasa en base seca; la densidad obtenida es buena y aceptable.



**Figura 24-3.** Liofilización de las muestras: *Scenedesmus* (izquierda) y *Chorella* (derecha)  
Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017

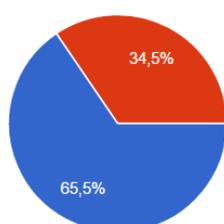
### 3.1.9 Demanda del prototipo de fotobiorreactor en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental- ESPOCH

Con las sugerencias planteadas en las dos encuestas, se corrigieron algunas partes de la técnica de laboratorio propuesta para la realización de prácticas y de la operación y mantenimiento del prototipo de fotobiorreactor, creando de esta manera una Guía de Prácticas de Laboratorio, que permite a los usuarios familiarizarse con el equipo y sus partes, su funcionamiento, forma correcta de limpieza, mantenimiento, expuesta en el Anexo G.



**Gráfico 3-3.** Resultados de la pregunta 1 de la primera encuesta.  
Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017

### Pregunta 2. ¿Cuál es su género?

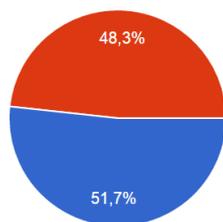


Femenino	19	65.5%
Masculino	10	34.5%

**Gráfico 4-3.** Resultados de la pregunta 2 de la primera encuesta.  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

La población a la que se realizó la encuesta correspondió a 29 estudiantes de noveno semestre de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH, las preguntas 1 y 2 buscaron recabar información general de los estudiantes, la primera pregunta permitió identificar el número de personas que pertenecían al penúltimo semestre de la carrera, mientras que la segunda pregunta determinó que el 65.5% pertenecen al género femenino, predominando sobre el al género masculino que correspondió al 34.5%

### Pregunta 3. ¿Conoce cuáles son los usos que tienen los fotobiorreactores?

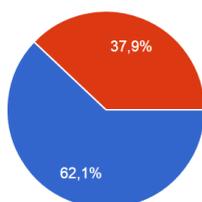


Sí	15	51.7%
No	14	48.3%

**Gráfico 5-3.** Resultados de la pregunta 3 de la primera encuesta.  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

El 51.7% afirmó conocer los usos que tienen los fotobiorreactores, siendo ésta una ligera mayoría sobre los que afirmaron desconocer los usos; este dato da la pauta de que en las diferentes asignaturas que reciben los estudiantes, aún no se ha abordado los diferentes tipos de reactores y su conocimiento es más bien, el resultado de la curiosidad e interés en el área.

### Pregunta 4. ¿Sabe cuáles son las aplicaciones de las microalgas en el campo de la Biotecnología?



Sí	18	62.1%
No	11	37.9%

**Gráfico 6-3** Resultados de la pregunta 4 de la primera encuesta.  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

Respecto a la pregunta 4, una mayoría del 62.1% afirmó tener conocimiento de las aplicaciones de las microalgas en el campo de la Biotecnología, es un buen punto de partida que evidencia los conocimientos teóricos adquiridos en las asignaturas recibidas en los semestres anteriores como en microbiología ambiental y biotecnología principalmente.

**Pregunta 5.** ¿Considera que el número de horas de prácticas de laboratorio recibidas en la carrera es suficiente para su formación profesional?



**Gráfico 7-3.** Resultados de la pregunta 5 de la primera encuesta.  
Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017

La pregunta 5 fue respondida de tal manera que más del 90 % de los encuestados consideró que el número de horas de prácticas de laboratorio recibidas en la carrera es insuficiente para su formación profesional, lo que pone en evidencia la necesidad de realizar más prácticas de laboratorio para fortalecer la competitividad y el desenvolvimiento práctico; cabe indicar que las prácticas de laboratorio generalmente se llevan a cabo con mayor frecuencia hasta quinto semestre, mientras que en los niveles de sexto a octavo las horas prácticas disminuyen significativamente, a partir de noveno semestre se puede afirmar que no existen mayor número de prácticas de laboratorio y en algunos casos definitivamente no se realizan prácticas a pesar de que son materias de especialización.

**Pregunta 6.** ¿Considera que la realización de prácticas de laboratorio con un prototipo de fotobiorreactor a escala laboratorio contribuiría en su aprendizaje académico?



**Gráfico 8-3.** Resultados de la pregunta 6 de la primera encuesta.  
Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017

De acuerdo a las respuestas planteadas en la pregunta 6, los estudiantes en su totalidad, consideran importante la realización de una práctica de laboratorio con el prototipo de fotobiorreactor construido dentro de su aprendizaje académico, este dato justifica en gran medida la demanda evidente de más equipos acorde a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental, en

especial en áreas que no han sido exploradas en trabajos de titulación anteriores en la Facultad de Ciencias.

La práctica de laboratorio se realizó el día 27 de enero de 16 a partir de las 8H00 am con una duración de 3 horas en el laboratorio de Análisis Instrumental y Calidad del agua. La segunda encuesta fue realizada el 3/02/16, tuvo como objetivo evaluar el desarrollo de la práctica, verificar el aprendizaje de las aplicaciones de los fotobiorreactores y recabar sugerencias para la elaboración del manual de uso del equipo.

**Pregunta 1.** ¿Se utilizó la metodología y el lenguaje adecuado durante la práctica?



**Gráfico 9-3** Resultados de la pregunta 2 de la segunda encuesta.  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

La metodología aplicada consistió en una charla introductoria de los fotobiorreactores, microalgas, técnicas de cultivo, aplicaciones; se entregó a los estudiantes con suficiente antelación la técnica de laboratorio y se dividió en grupos de 5 personas, se solicitó la entrega de un informe de laboratorio 8 días después de la práctica. Respecto a la pregunta 1 de la segunda encuesta, el 96.6% afirmó que la metodología y el lenguaje fueron apropiados durante la práctica, lo que lleva a mantener este método, con una consideración para grupos mayores de 30 personas, fijar horarios y asignaciones por grupo concatenadas, de tal manera que todos formen parte de la práctica de laboratorio y sus aportes formen parte de un todo.

**Pregunta 2.** ¿Se comprendió el funcionamiento del fotobiorreactor?



**Gráfico 10-3** Resultados de la pregunta 2 de la segunda encuesta.  
**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

Respecto a la pregunta 2, más del 90 % afirmó que se comprendió el funcionamiento del fotobiorreactor, lo que motiva a mantener la pedagogía de enseñanza aprendizaje, sin embargo, se considera hacer más dinámica la práctica, de tal manera que haya una interacción y

retroalimentación, además es importante que los estudiantes puedan manipular y controlar por ellos mismos los componentes del fotobiorreactor y evalúen el funcionamiento de sus partes, de tal manera que si uno de sus componentes llegara a fallar puedan suplir ese contratiempo.

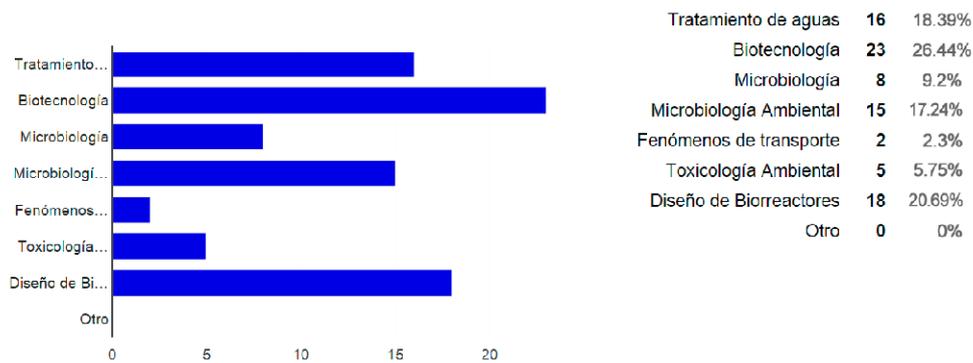
**Pregunta 3.** ¿Se comprendieron las aplicaciones potenciales de las microalgas en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental?



**Gráfico 11-3** Resultados de la pregunta 3 de la segunda encuesta.  
Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017

A lo planteado en la pregunta 3, el 89.7% afirmó que se comprendieron las aplicaciones en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de las microalgas, se explicó durante la práctica los usos de varias especies de microalgas, sin embargo, se considera importante que los estudiantes profundicen una o varias de las aplicaciones que les haya resultado de su interés con la revisión de artículos científicos indexados, si discusión y se planteen la posibilidad de modificar y replicar las técnicas propuestas en los artículos, adaptándolos a las condiciones de los laboratorios de la Facultad de Ciencias.

**Pregunta 4.** ¿Hacia qué asignaturas considera que el uso del fotobiorreactor debería estar orientado?



**Gráfico 12-3** Resultados de la pregunta 4 de la segunda encuesta.  
Realizado por: Chicaiza, Cristhian, 2017

Para la pregunta 4, el 26.44% de los encuestados consideró que el prototipo de fotobiorreactor debería estar orientado a la asignatura de Biotecnología, seguidamente el 20.69% consideró pertinente que el equipo pueda ser utilizado en prácticas de diseño de fotobiorreactores; para tratamiento de aguas y microbiología ambiental se consideró un 16% y 15% respectivamente. Son estas 4 asignaturas, más otras materias de carácter profesionalizante, primordiales en la

formación de los futuros profesionales de Ingeniería en Biotecnología Ambiental, determinando de esta manera la importancia del uso del equipo en la adquisición de habilidades prácticas de los estudiantes.

**Pregunta 5.** ¿Cuál considera que debe ser el enfoque de los trabajos de titulación respecto al diseño y construcción de equipos en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH?



**Gráfico 13-3** Resultados de la pregunta 2 de la segunda encuesta.

**Realizado por:** Chicaiza, Cristhian, 2017

La última pregunta debe ser considerada por quienes vayan realizar el diseño y construcción de equipos en calidad de trabajos de titulación en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, el 51.7% considera que se deben realizar equipos enfocados a la producción; un valor representativo del 44.8% cree que los trabajos de titulación respecto al diseño y construcción deben ser de carácter investigativo, esto se puede deber a la constante motivación de docentes y autoridades institucionales a realizar investigación.

Con una vasta revisión bibliográfica y evaluación los fundamentos de la parte experimental, diseño del prototipo, construcción del equipo, la realización de pruebas experimentales, se puede afirmar que el prototipo de fotobiorreactor es un instrumento académico útil complementario en la formación profesional de los estudiantes de la Ingeniería de Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, frente a la falta de equipamiento en esta área de la biotecnología.

Por medio de estas encuestas, se logró determinar la falta de prácticas de laboratorio, la necesidad de trabajar con fotobiorreactores y microalgas en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental, que puede ser aplicada en varias asignaturas de varios semestres, pudiendo realizarse prácticas diversas como aislamiento e identificación de microalgas en la materia de microbiología, tratamiento de efluentes residuales en la cátedra de tratamiento de aguas, la evaluación de los parámetros óptimos para la obtención de biodiesel en la asignatura de Biotecnología Ambiental, y la implementación de mejoras al equipo en diseño de biorreactores.

## CONCLUSIONES

- Por medio de una encuesta realizada a 29 estudiantes de noveno nivel de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH, se determinó que más del 50% tiene los conocimientos teóricos del uso de fotobiorreactores y las aplicaciones de microalgas, y que podrán ser llevadas a la práctica de laboratorio estudiantil inicialmente con el uso del prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio propuesto en este trabajo sobre todo en las asignaturas: biotecnología, diseño de fotobiorreactores, tratamiento de aguas y microbiología ambiental.
- Mediante referenciación bibliográfica se planteó el diseño del prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio: geometría, materiales, costos, equipos y condiciones de laboratorio, construyéndose el equipo con base hexagonal de aluminio de 60 cm medidos de extremo a extremo, que soporta 6 lámparas LED y 6 tubos de acrílico con una altura de 60 cm, que tienen un ingreso de  $0.0378 \text{ cm}^3$  de  $\text{CO}_2/\text{s}$  a través de difusores conectados a una bomba de aire para peceras. el armazón es de cristal reflectivo que permite concentrar la luz, una base para los cilindros con una llave de paso para la recolección de muestras para medir la absorbancia y la parte superior con una abertura para el ajuste de pH y registro de la temperatura.
- Se comparó la producción de *Scenedesmus* frente a lo generado por *Chlorella vulgaris*, determinando una relación del producto de 1.61 y 1.48 veces más de biomasa húmeda y seca, respectivamente al cabo de 3 semanas de cultivo en el prototipo de fotobiorreactor bajo las mismas condiciones: fotoperiodos de día largo, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, medio de cultivo BG11, cantidad del inóculo, inyección de  $\text{CO}_2$ , regulación de pH a un rango de 7.5 y 8.5
- El manual de uso del equipo que expone: un fundamento teórico, los componentes, la operatividad, el mantenimiento y la limpieza del equipo, una práctica de laboratorio que puede ser acoplada a varias asignaturas, que reúne las sugerencias de los estudiantes y el docente.
- La biomasa húmeda obtenida en el prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio es similar a la biomasa obtenida en otros trabajos de investigación basados en el cultivo de los mismos géneros de microalgas.
- El control de las variables: pH, absorbancia y temperatura fue de gran importancia para explicar el comportamiento de las curvas de crecimiento en los 2 lotes de producción de las microalgas.

## RECOMENDACIONES

- Para el uso del prototipo de fotobiorreactor se sugiere revisar el manual de uso antes de su utilización, con el fin de evitar inconvenientes al momento del cultivo.
- Antes y después de cultivar microalgas en el equipo se recomienda limpiar interna y externamente los componentes con alcohol potable y exposición a luz Ultra violeta al menos 5 minutos.
- Para diversificar el cepario de microalgas se recomienda aislar e identificar otros géneros/especies que puedan resultar de interés.
- Si se desea construir otro fotobiorreactor con fines comerciales, se sugiere que el diseño contemple trabajar con luz solar, para evitar el consumo de electricidad y sea de mayor volumen y de operación continua para tener una producción constante.
- Se recomienda la implementación de tiras LED para maximizar la intensidad lumínica dentro del prototipo.
- En virtud de que el medio de cultivo actúa como un limitante, se sugiere realizar ensayos en semicontinuo o semi batch para evitar la fase de muerte celular durante la producción de biomasa.
- Para futuras investigaciones se recomienda hacer ensayos con diferentes medios de cultivo, más económicos como urea, nitrofoska foliar, aguas residuales previamente tratadas

## BIBLIOGRAFÍA

**ALVEAR, F.**, “Diseño de un fotobioreactor industrial para cultivo de microalgas destinadas a la producción de biodiesel en la ciudad de Guayaquil” (tesis) [en línea] Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil 2015, pp. 4-5 [Consulta: 05 febrero 2016]. Disponible en: <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/94483/D-CD88192.pdf>

**BAJPAI, R., ZAPPI, M., DUFRECHE, S., SUBRAMANIAM, R., PROKOP, A.** *Status of Algae as Vehicles for Commercial Production of Fuels and Chemicals*. Cultivation of Cells and Products, 2014 London (Gran Bretaña) Ed. Springer Netherlands ISBN 978-94-007-7494-0 pp. 3-5, 178 [Consulta: 05 enero 2016]. Disponible en: [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-007-7494-0\\_1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-007-7494-0_1)

**BOROWITZKA, M., MOHEIMANI, N.**, *Algae for biofuels and energy* Springer, [en línea], ISBN: 978-94-007-5478-2, 2013, New York, pp. 1-4, 223 [Consulta: 11 marzo 2016]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=z3TWBwo1exoC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

**CARVAJAL, A.**, *Las algas son la base de nueva energía renovable* [en línea] Quito, ed. 14/03/2015 [Consulta: 05 julio 2016]. Disponible en: <http://especiales.elcomercio.com/planeta-ideas/planeta/14-marzo-2015/algas-energia-renovable-biodiesel>

**CHUN-YEN, C., YU-HAN, C., HSIN-YUEH, C.**, *Outdoor cultivation of Chlorella vulgaris FSP-E in vertical tubular-type photobioreactors for microalgal protein production*. Algal Research, 2015, Tainan (Taiwán) pp.266 , [Consulta: 07 julio 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.006>

**DAUCHET J., CORNET, J., GROS, F., ROUDET, M., DUSSAP, C.**, *Photobioreaction Engineering*. Photobioreactor Modeling and Radiative Transfer Analysis for Engineering Purposes, 2016 Aubiere (Francia) Ed. Elsevier Inc ISSN 0065-2377 pp. 2,3, [Consulta: 05 julio 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ache.2015.11.003>

**DÁVILA, G., OCHOA, V.,** Evaluación de las condiciones de cultivo autotrófico de microalgas *Chlorella* para la producción de Biodiesel [En línea] (tesis) (Pregrado) Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias e Ingeniería, Quito, Ecuador, 2013, pp.14-21. [Consulta: 14 marzo 2016]. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2404/1/107095.pdf>

**DEBABRATA DAS,** *Algal Biorefinery: An Integrated Approach*; Photobioreactors for Improved Algal Biomass Production: Analysis and Design Considerations, 2015 New Delhi (India) Ed. Springer International Publishing ISBN 978-3-319-22812-9 pp. 103-119 [Consulta: 05 enero 2016]. Disponible en: [http://www.bioh2iitkgp.in/docs/e-book\\_Algal%20Biorefinery.pdf](http://www.bioh2iitkgp.in/docs/e-book_Algal%20Biorefinery.pdf)

**FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura,** *Cultivo de microalgas* [en línea] [Consulta: 05 julio 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/ab473s02.htm>

**FERNÁNDEZ, J.,** Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas. Nutrientes y medios de cultivo de microalgas. 2014 (España) [Consulta: 05 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-3-nutrientes.html>

**FLORES, C., PEÑA, J., FLORES, L., CAÑIZARES, R.,** “Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas.” [en línea]. ISSN 0378-1844, 2003 (México) vol.28, n.8 [Consulta: 07 febrero 2016], pp. 450-456. Disponible en: [http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442003000800004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003000800004&lng=es&nrm=iso).

**GIKONYO, B., et.al.** *Efficiency and sustainability in biofuel production*, Toronto, (Canadá) Apple Academic Press, ISBN 9781498728867, 2015, pp. 15-20 [Consulta: 05 febrero 2016]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=9OI\\_CQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=9OI_CQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

**GONZÁLEZ, C., SOL, M., FRANCO, M.,** “Estimación de iluminación en un fotobiorreactor productor de biomasa a partir de Microalgas” [en línea]. ISSN 1405-5597, 2014, (México), n.47 [Consulta: 07 febrero 2016], pp. 29.

Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4749367>

**HELE, J.** *Algal Culturing Techniques*, [en línea], ISBN: 0-12-088426-7, 2005, China, [Consulta: 12 marzo 2016]. Disponible en: <https://goo.gl/nyHxxF>

**HUESEMANN, M., ROESJADI, G., BENEMANN, J., METTING, B.,** *Biofuels from Microalgae and Seaweeds*. Biomass to Biofuels: Strategies for Global Industries. 2010 (London - Gran Bretaña) pp. 170-171 [Consulta: 05 enero 2016]. Disponible en: <http://online.library.wiley.com/doi/10.1002/9780470750025.ch8/summary>

**INREDH, FUNDACIÓN REGIONAL DE ASESORÍA EN DERECHOS HUMANOS,** *Apuntes sobre la explotación petrolera en el Ecuador*, [en línea], [Consulta: 11 enero 2016] Disponible en: [http://www.inredh.org/index.php?option=com\\_content&id=288:explotacion-petrolera-en-el-ecuador&Itemid=126](http://www.inredh.org/index.php?option=com_content&id=288:explotacion-petrolera-en-el-ecuador&Itemid=126)

**IPCC,** 2014: Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático, [en línea], ISBN 978-92-9169-343-6, 2015 Ginebra (Suiza) pp 110,117 Disponible en: [https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR\\_AR5\\_FINAL\\_full\\_es.pdf](https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_FINAL_full_es.pdf)

**JESWANI, H., AZAPAGIC, A.,** “Life cycle sustainability assessment of second generation biodiesel” *Advances in Biodiesel Production* [en línea], 2012 (Reino Unido) pp. 13-14 [Consulta: 07 febrero 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857095862.1.13>

**JIN, L., FENG, C.,** *Biology and Industrial Applications of Chlorella: Advances and Prospects*. Microalgae Biotechnology. 2016 (Suiza) pp. 2-4 Springer. ISBN 978-3-319-23808-1 [Consulta: 05 enero 2016]. Disponible en: <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-319-23808-1>

**KRISHNA, A., DEV, L., THANKAMANI V.,** “An integrated process for Industrial effluent treatment and Biodiesel production using Microalgae” *Research in Biotechnology*, [en línea], ISSN 2229-791X, 2012 (India) 3(1), pp. 47-48. Disponible en: <http://researchinbiotechnology.com/article/view/72/69>

**LI, M., HU, D., LIU, H.,** “Photobioreactor with ideal light–dark cycle designed and built from mathematical modeling and CFD simulation” *Ecological Engineering* [en línea], 2014 (China) 73, pp. 162–167 [Consulta: 05 febrero 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.010>

**LUNDQUIST, T., WOERTZ, I., QUINN, I., BENEMANN, J.,** *A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production*, 2010 California (Estados Unidos) 2010, 1, pp. 3, 14 [Consulta: 21 mayo 2016]. Disponible en: <http://www.energybiosciencesinstitute.org/media/AlgaeReportFINAL.pdf>

**LÜRLING, M.,** “Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology” *International Journal of Limnology* [en línea], 2003 (Estados Unidos), 39, pp. 85-87. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1051/limn/2003014>

**MARQUES, A., MIRANDA, J., BATISTA, A., GOUVEIA L.,** *Microalgae biotechnological applications: nutrition, health and environment*. Microalgae: biotechnology, microbiology and energy, 2012. New York (Estados Unidos) Nova Science Publishers ISBN: 978-1-62257-868-9 pp. 6,7

**MOKEBO, K.,** Ultrahigh Productivity Photobioreactors for Algal Biofuel Production. [En línea] (tesis) (Doctor of Philosophy (PhD)). University of Bath, Facultad de Ciencias, Área de Química, Bath, Inglaterra, 2012, pp. 37-47 [Consulta: 14 marzo 2016]. Disponible en: [http://opus.bath.ac.uk/38303/1/UnivBath\\_PhD\\_2012\\_K\\_Mokebo.pdf](http://opus.bath.ac.uk/38303/1/UnivBath_PhD_2012_K_Mokebo.pdf)

**Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra (PUCE-SI)** *En la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales se presentaron los avances de interesante investigación sobre algas unicelulares* [Consulta: 15 marzo 2016]. Disponible en: [http://pucesi.edu.ec/index.php?option=com\\_content&view=article&id=840:en-la-escuela-de-ciencias-agricolas-y-ambientales-se-presentaron-los-avances-de-interesante-investigacion-sobre-algas-unicelulares&catid=99&Itemid=1045](http://pucesi.edu.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=840:en-la-escuela-de-ciencias-agricolas-y-ambientales-se-presentaron-los-avances-de-interesante-investigacion-sobre-algas-unicelulares&catid=99&Itemid=1045)

**PULZ, A., SCHEIBENBOGEN, K.,** “Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input” Springer, 1998 (Alemania) 59, ISSN 0724-6145, pp. 147-148 [Consulta: 05 febrero 2016] Disponible en: <http://link.springer.com/chapter/10.1007%2FBFb0102298>

**RENEWABLES,** 2015: *Global Status Report: Annual Reporting on Renewables: Ten years of excellence*. [en línea] ISBN 978-3-9815934-6-4, 2015 Paris (Francia) pp. 112-121. Disponible en: [http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2015/07/REN12-GSR2015\\_Onlinebook\\_low1.pdf](http://www.ren21.net/wp-content/uploads/2015/07/REN12-GSR2015_Onlinebook_low1.pdf)

**SAFI, C., ZEBIB, B., MERAH, O., PONTALIER, P., VACA, C.** “Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [en línea], 2014 Toulouse (Francia) 35 pp. 266-268 [Consulta: 11 febrero 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

**SANDOVAL, M.**, Diseño, construcción y puesta en marcha de un fotobioreactor piloto para el crecimiento de la microalga *Chlorella SP* en el laboratorio de biotecnología y energías renovables de la EMPRESA ELÉCTRICA QUITO [En línea] (tesis) (Pregrado) Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida, Quito, Ecuador, 2013, pp.121 [Consulta: 14 marzo 2016]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/6487/1/T-ESPE-047130.pdf>

**SARIN, A.**, *Biodiesel Production and Properties*, India, Royal Society of Chemistry, ISBN 1849734704, 2012, pp. 1-3 [Consulta: 05 febrero 2016]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=72klFb2goSUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=72klFb2goSUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

**SENPLADES, SECRETARÍA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO**, 2013 *Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017* Quito (Ecuador) ISBN 978-9942-07-448-5 pp.82,128

**SERRA, R., BERNARD, O., GONÇALVES, A., BENSALÉM S., LOPES, F.**, “Influence of temperature on *Chlorella vulgaris* growth and mortality rates in a photobioreactor” *Algal Research*, Vol 18, [en línea] 2016, Saclay (Francia), pp. 356, 358 Université Paris Saclay. [Consulta: 07 noviembre 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.16.06.016>

**SHIHO, M., KAWACHI, M., HORIOKA, K., NISHITA, Y., OHASHI, K., KAYA, K., WATANABE, M.**, “Business Evaluation of a Green Microalgae *Botryococcus Braunii* Oil Production System” *Procedia Environmental Sciences*, [en línea], ISSN 1878-0296, 2012 (Japón), 15, pp. 90-93. [Consulta: 09 noviembre 2016] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proenv.2012.05.014>

**SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROALGAS Y SUBPRODUCTOS**, *Scenedesmus*, [en línea] Cádiz (España), sf. [Consulta: 05 julio 2016]. Disponible en: <http://www.seaweed.es/productos/scenedesmus/>

**THE SCOTTISH ASSOCIATION FOR MARINE SCIENCE**, BG11 (Blue-Green Medium) Freshwater algae and protozoa [en línea] (Reino Unido), [Consulta: 05 junio 2016]. Disponible en: <https://www.ccap.ac.uk/media/documents/BG11.pdf>  
<https://www.ccap.ac.uk/media/documents/BB.pdf>

**TREDICI, M., BIONDI, N., PONIS, E., RODOLFI, L., CHINI, G.**, *New Technologies in Aquaculture*, [en línea] 2009 (Italia) pp.317-620, Università degli Studi di Firenze [Consulta: 07 febrero 2016]. ISBN 9781845696474 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-84569-384-8.50039-7>

**UGWU, C., AOYAGI, H., UCHIYAMA H.**, Photobioreactors for mass cultivation of algae, [en línea] 2008 Ibaraki (Japón) pp.2-3, Universidad de Tsukuba [Consulta: 07 febrero 2016]. ISBN 9781845696474 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379512>

**WAN, C.**, “Biotechnological applications of microalgae” *International e-Journal of Science, Medicine & Education*. [en línea] 2012. (Malaysia) 6 pp. 24, 25, 31-33. [Consulta: 05 marzo 2016]. Disponible en: [http://seacolors.eu/images/Biotechnological\\_applications\\_of\\_microalgae.pdf](http://seacolors.eu/images/Biotechnological_applications_of_microalgae.pdf)

**YCAZA, I.**, *Las Microalgas, lo que hacemos con estos organismos* [en línea] San Miguel de Urucuquí (Ecuador), ed. 31/05/2016 [Consulta: 05 julio 2016]. Disponible en: <http://www.yachaytech.edu.ec/conectate/noticias/detalle/articulo/las-microalgas/>

**ZHU, X., WANG, J., LU, Y., CHEN Q., YANG, Z.**, "Grazer-induced morphological defense in *Scenedesmus obliquus* is affected by competition against *Microcystis aeruginosa*" *Nature* [en línea], 2015 (China) 5, pp. 1,2 DOI:10.1038/srep12743 [Consulta: 05 febrero 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/srep12743>

## ANEXO A

Modelo de la primera encuesta aplicada a los estudiantes de noveno semestre de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH antes de la realización de la práctica de laboratorio



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**



La presente encuesta tiene por objetivo recabar datos sobre el conocimiento de los estudiantes de Ingeniería en Biotecnología Ambiental respecto al uso de los fotobiorreactores y las aplicaciones de microalgas.

Instrucciones:

- Lea atentamente cada una de las preguntas
- Marque con una equis (X) la alternativa que más lo identifique
- Conteste todas las preguntas

### 1. Información general

¿En qué semestre se encuentra? \_\_\_\_\_

¿Cuál es su género?

( ) Masculino ( ) Femenino

### 2. Encuesta

2.1. ¿Conoce cuáles son los usos que tienen los fotobiorreactores?

( ) Si ( ) No

2.2. ¿Sabe cuáles son las aplicaciones de las microalgas en el campo de la Biotecnología?

( ) Si ( ) No

2.3. ¿Considera que el número de horas de prácticas de laboratorio recibidas en la carrera es suficiente para su formación profesional?

( ) Si ( ) No

2.4. ¿Considera que la realización de prácticas de laboratorio con un prototipo de fotobiorreactor a escala laboratorio contribuiría en su aprendizaje académico?

( ) Si ( ) No

*Muchas gracias por su valiosa colaboración*

## ANEXO B

Modelo de la segunda encuesta aplicada a los estudiantes de noveno semestre de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH posterior a la realización de la práctica de laboratorio.



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**



La presente encuesta tiene por objetivo evaluar la práctica de laboratorio realizada el 27 de enero de 2016.

Instrucciones:

- Lea atentamente cada una de las preguntas
- Marque con una equis (X) la alternativa que más lo identifique
- Conteste todas las preguntas

1. ¿Se utilizó la metodología y el lenguaje adecuado durante la práctica?  
 Si  No
2. ¿Se comprendió el funcionamiento del fotobiorreactor?  
 Si  No
3. ¿Se comprendieron las aplicaciones potenciales de las microalgas en la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental?  
 Si  No
4. ¿Hacia qué asignaturas considera que el uso del fotobiorreactor debería estar orientado? *Se puede escoger más de una opción*  
 Tratamiento de aguas  
 Biotecnología  
 Microbiología  
 Microbiología Ambiental  
 Fenómenos de transporte  
 Toxicología Ambiental  
 Diseño de Biorreactores  
 Otra
5. ¿Cuál considera que debe ser el enfoque de los trabajos de titulación respecto al diseño y construcción de equipos en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH?  
 Didáctico  Productivo  Investigativo  Otro

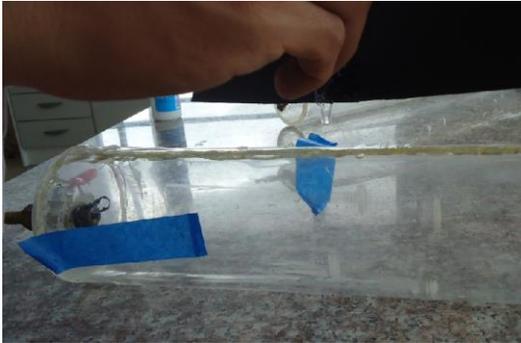
*Muchas gracias por su valiosa colaboración*

## ANEXO C

Construcción de prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio para la producción de biomasa algal.



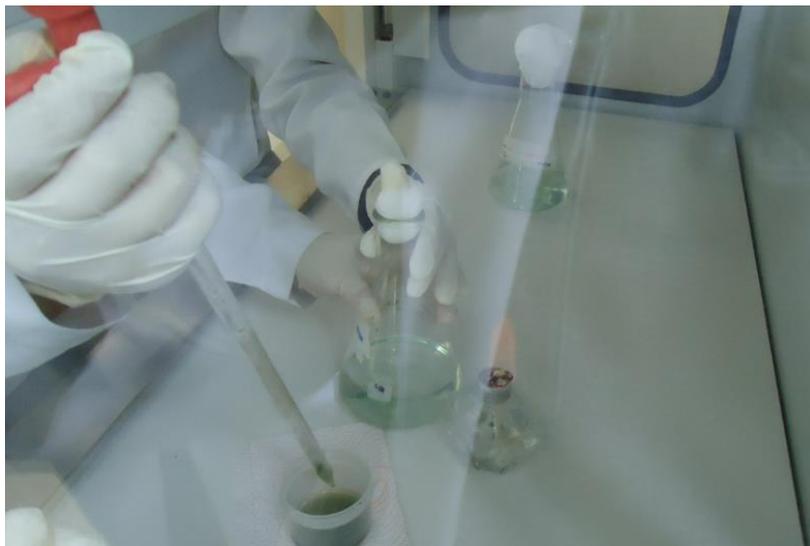
a) Igualar la boca superior de un cilindro



b) Pegado de los tubos de acrílico con pegamento epóxico.

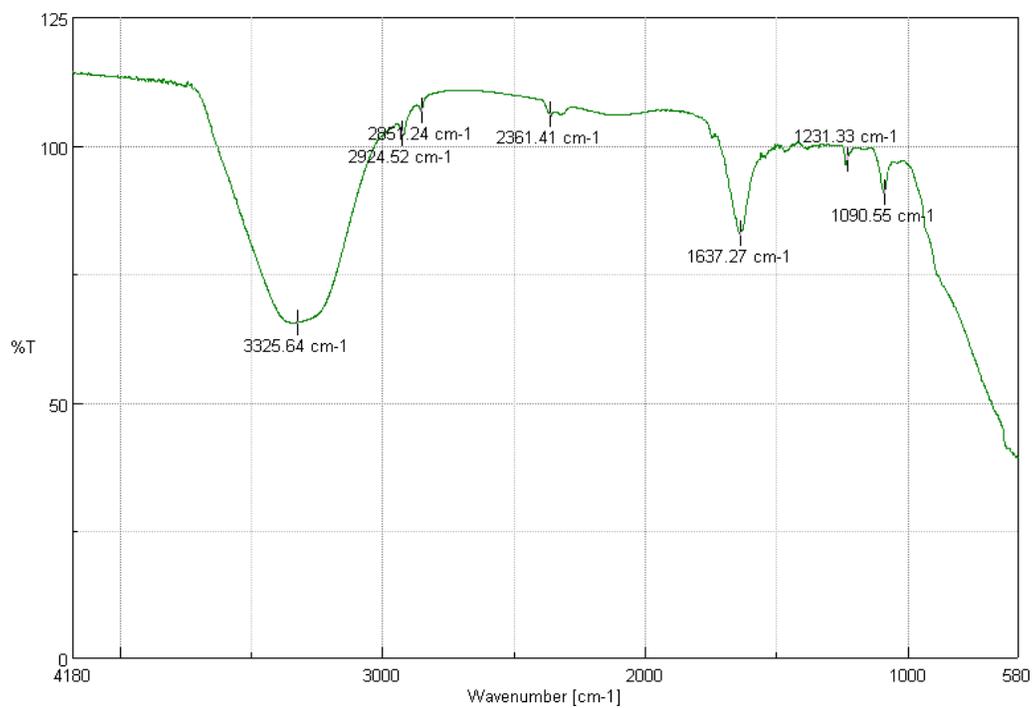
## ANEXO D

Desarrollo de la práctica de laboratorio con los estudiantes de Ingeniería en Biotecnología Ambiental

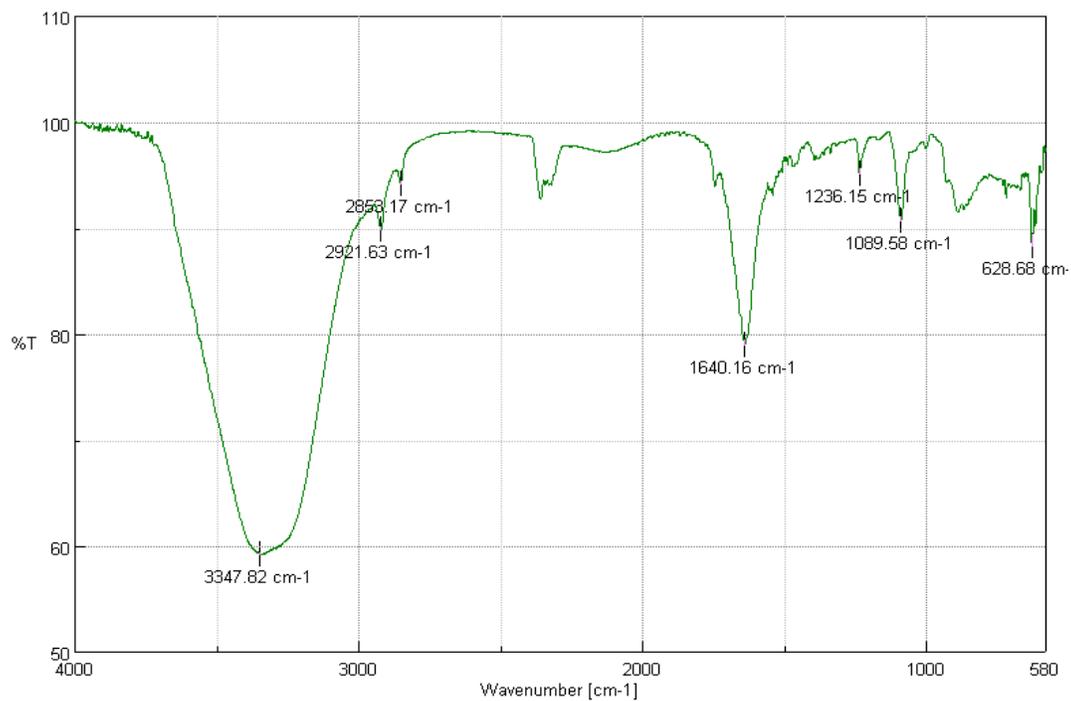


## ANEXO E

Determinación de grupos funcionales realizados en el Infrarrojo para *Chlorella vulgaris*



Determinación de grupos funcionales realizados en el Infrarrojo para *Scenedesmus*.



## ANEXO F

Registro de asistentes en la práctica de laboratorio preparada para los estudiantes de novenos semestre de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH



# ESPOCH

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

Trabajo de titulación: "Diseño y construcción de un prototipo de fotobiorreactor"

27/enero/2016

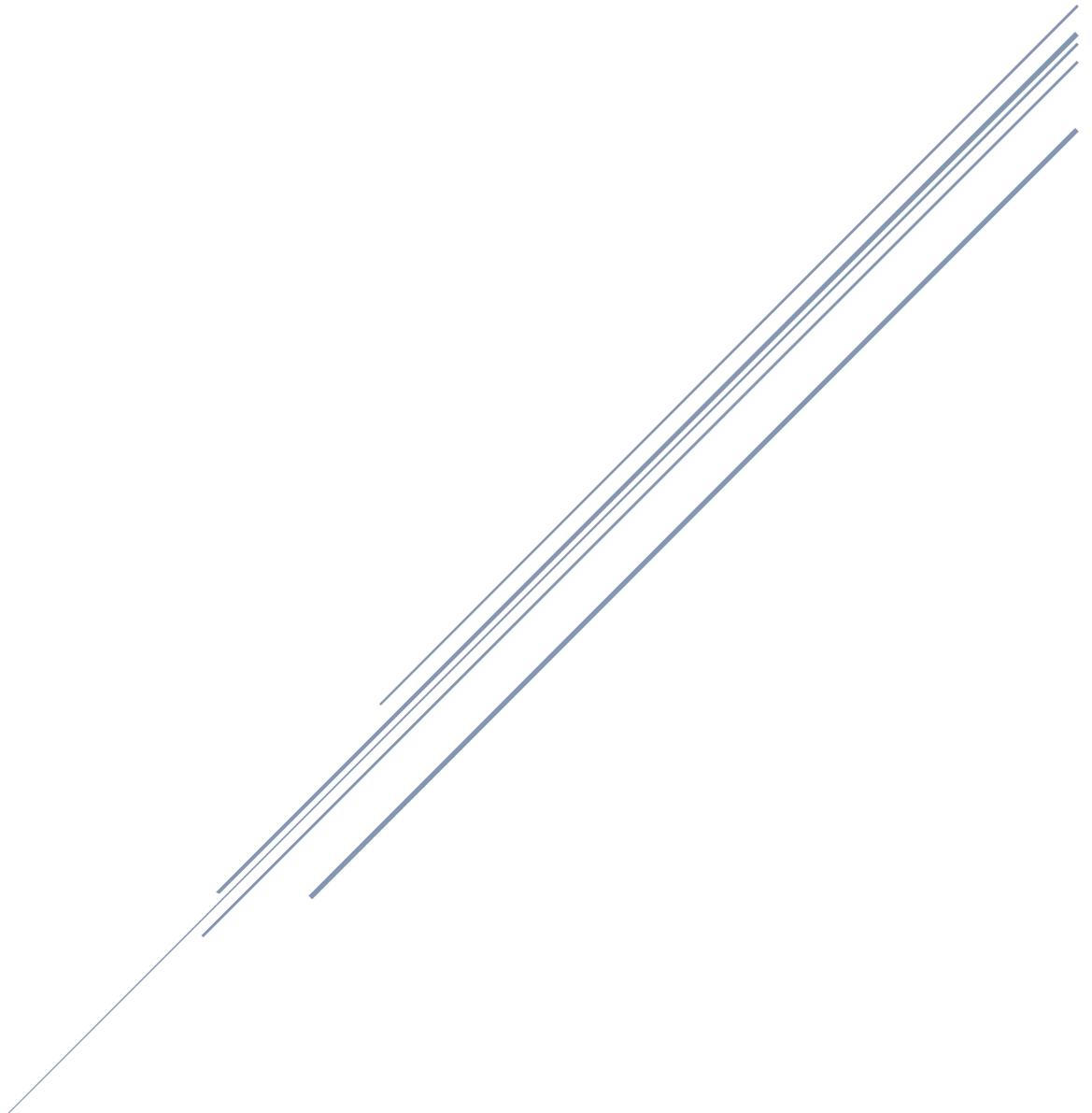
Registro de asistentes en la práctica de laboratorio "Evaluación del crecimiento de microalgas en un fotobiorreactor con potencial para generar biodiesel y como proceso complementario al tratamiento de aguas residuales."

N°	Nombres	Apellidos	Firma
1	Bryan Fabian	Andrés Rojas	
2	Patricia Estelbania	Cara Villaharte	
3	Tatiana Vanessa	Dávila Piro	
4	Rodrigo Rose	Guerrero Shaca	
5	Carolina Deysi	Martinez Jara	
6	Kevin Alexander	Veloz Canudo	
7	Theresa Pamela	Nauromete Villa	
8	Nelson Roberto	Albais Guzman	
9	Juan Pablo	Llanusa Navay	
10	Cristian David	Jara Rose	
11	Christian Esteban	Cordano Gamba	
12	Cristian Haroldo	Beltrán Erazo	
13	Jennifer Alexandra	Orjuela Romero	
14	Quiana Píez	Mora Carolina	
15	Daniela Carolina	Horillo Berroco	
16	Hilda Marlène	Rochina Chimbo	
17	Diana Sofia	Colouca Anarri	
18	Mara Fernanda	Loayza Vargas	
19	Inna Alexandra	Calvo Quezada	
20	Calvin Humberto	Palgas Vane	
21	Eduardo Patricio	Lozano Ana	
22	Jairon Vicente	Bermudez Sando	
23	Sandra Paola	Freire Rumi-pamba	
24	Marcia Ximena	Pacheco Cuzcohumbi	
25	Greys Carolina	Havera Morales	
26	Verónica Maresa	Morales Agala	
27	Ana Marcela	Martinez Padron	
28	Ulivia Estefania	Arturovilla Uguero	
29	Jessy Nataly	Urbano Chelivisco	
30			
31			
32			
33			
34			
35			

**ANEXO G**

**MANUAL DE USO DE UN PROTOTIPO DE FOTOBIORREACTOR  
DISCONTINUO A ESCALA LABORATORIO**

*Riobamba, 2017*



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

# INTRODUCCIÓN

Manual de uso de un prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio

## **Introducción**

El propósito de este manual tiene como objetivo presentar los fundamentos teóricos básicos, facilitar el uso y mantenimiento del prototipo de fotobiorreactor discontinuo a escala laboratorio, presentado como el resultado del trabajo de titulación dirigido por el Dr. Gerardo León y la Ing. Sofía Godoy Mg; para fortalecer la formación los futuros profesionales de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

## **Fundamento teórico.**

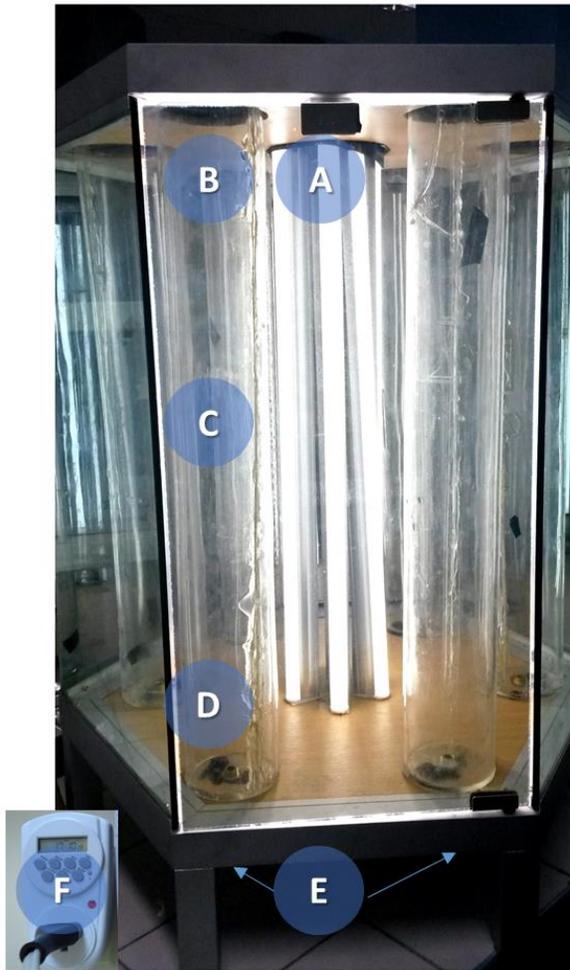
Se prevé que la biotecnología de las algas abriría paso al desarrollo del Sistema de Apoyo a la Vida Ecológica Cerrada (CELSS), el reto actualmente es utilizar eficazmente la energía solar para la producción de biomasa algal. Los fotobiorreactores cerrados permiten un mejor control de las condiciones de cultivo que los sistemas abiertos, la productividad de biomasa es mayor y se puede prevenir fácilmente la contaminación, la mayoría de los fotobiorreactores se caracterizan por superficies de iluminación en gran parte expuestas. (Ugwu, et al., 2008, pp. 2,3)

Un fotobiorreactor busca evitar el contacto con el medio ambiente externo, para impedir contaminación y cambios bruscos en las condiciones internas del contenedor que podrían afectar a la biomasa, tiene condiciones más controladas de cultivo como la dosificación de nutrientes, una mejor distribución de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). (Tredici, et al. 1999 pp. 617-620).

Los fotobiorreactores han encontrado aplicaciones en diferentes campos, farmacia, cosméticos y alimentos para la acuicultura, cabe señalar que el desarrollo de fotobiorreactores industriales aún requiere de esfuerzos de optimización, para lograr una alta tasa de producción volumétrica para la implementación a gran escala. Los nuevos avances tecnológicos son más radicales para su aplicación en biorefinería de algas. (Dauchet, et al, 2016).

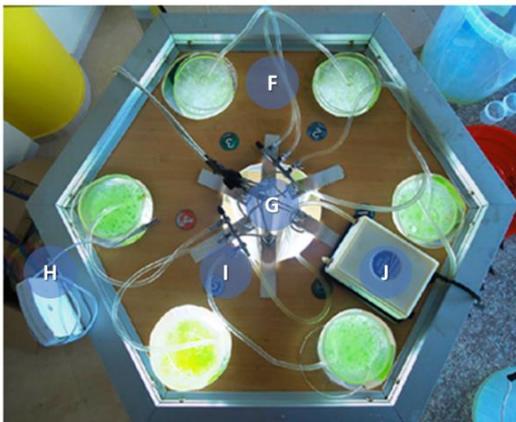
Los fotobiorreactores tubulares tienen ventajas como: gran superficie de iluminación, baja contaminación, buena productividad de la biomasa, control de temperatura posible, mezcla uniforme, escalabilidad razonablemente simple; sus desventajas son: grado de ensuciamiento del crecimiento de la pared, requiere amplias áreas del suelo, mezcla ineficiente de O<sub>2</sub> disueltos y gradientes de dióxido de carbono a lo largo de tubos.

## Componentes



- A. Sistema de iluminación
- B. Tubos de acrílico
- C. Mangueras
- D. Difusores de aire
- E. Llaves de Paso
- F. Timer/temporizador

Vista frontal del equipo



- G. Soporte de madera superior
- H. Sistema eléctrico en paralelo
- I. Termómetro digital
- J. Sistema de distribución de aire.
- K. Bomba de aire

Vista Superior del equipo

## **Operatividad**

1. Verificar que el enchufe se encuentre conectado
2. Programar el timer, se recomienda trabajar en tiempos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad o también 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.
3. Esterilizar en el autoclave (15 psi de presión, 121 °C por 30 minutos) las mangueras, difusores (envueltas en papel de empaque, rotuladas previamente), colocar en una estufa de secado por 2 horas a 90 °C para retirar la humedad.
4. Preparar un volumen de 15 litros de medio cultivo, se sugiere el uso de agua destilada en la cámara de flujo laminar considerando las concentraciones de las sales de la práctica de laboratorio
5. Separar el medio cultivo en 2 recipientes, de tal manera que se tenga 7.5 L para el cultivo de una especie y 7.5 para el cultivo de otra especie.
6. Inocular el 5% con la especie escogida previamente en los recipientes rotulados previamente.
7. Distribuir en 6 tubos de acrílico el contenido de los baldes
8. Conectar las 6 mangueras con sus difusores a la bomba de aire.
9. Conectar la bomba de aire a un tomacorriente y verificar que el paso de aire sea uniforme en los 6 difusores
10. Colocar tubos de acrílico con el contenido en la estructura del equipo, de tal manera que exista correspondencia entre los números de los tubos y los números que están en la parte superior de la estructura.
11. Controlar variables de Temperatura, absorbancia, pH.
12. Cosechar la biomasa.

## **Limpieza y mantenimiento del equipo**

1. La limpieza debe realizarse con mucho cuidado cada vez que se termine un lote de producción, se puede utilizar algunas estrategias para desinfección y esterilización del.
2. Lavar con agua una solución de NaOCl al 0,04% y NaOH al 0,2%, emplear tres veces agua desionizada, se puede usar también una disolución de NaOH al 1% durante 15-20 minutos.
3. Los tubos no pueden ser autoclavados porque podrían su forma al ser sometidos a altas temperaturas, por lo que se recomienda colocarlos en una cámara de flujo o cámara de seguridad biológica por 15 minutos expuestos a luz UV. El resto de componentes como mangueras, difusores, llaves de paso debe ser llevado al autoclave a las condiciones expuestas anteriormente.

4. En caso de que existan fisuras en los tubos de acrílico, colocar pegamento epóxico sobre la superficie previamente limpia y seca. El tubo puede ser usado 48 horas posteriores a este tratamiento.
5. La limpieza interna y externa del equipo debe realizarse con toallas absorbentes o una franela limpia, empleando abundante alcohol potable.

### **Práctica de laboratorio**

*Tema:* Evaluación del crecimiento de microalgas en un fotobiorreactor con aplicaciones en el área de la Biotecnología Ambiental

*Objetivos:*

- Cultivar *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* a condiciones de laboratorio
- Realizar el control de pH, Temperatura, concentración de microalgas
- Comparar la tasa de crecimiento *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* en el fotobiorreactor.
- Emplear la biomasa generada en alguna aplicación del campo de la biotecnología ambiental

*Materiales:*

Por el Curso:

Galón de Agua destilada  
Toallas Absorbentes  
Papel Aluminio  
Cinta masqui  
Rotulador

Individuales:

Mandil  
Mascarilla  
Par de guantes

*Procedimiento:*

CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* Y *Scenedesmus* A CONDICIONES DE LABORATORIO.

1. Preparación de medios de cultivo líquido
  - a) Autoclavar los materiales a emplearse
  - b) Preparar las Soluciones stock 1, 2 y 3

## BG11 (Blue-Green Medium)

Freshwater algae and protozoa

Stocks	per litre
(1) NaNO <sub>3</sub>	15.0 g
(2) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0 g
(3) MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.75 g
(4) CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.80 g
(5) Citric acid	0.30 g
(6) Ammonium ferric citrate green	0.30 g
(7) EDTANa <sub>2</sub>	0.05 g
(8) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.00 g
(9) Trace metal solution:	per litre
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.22 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.39 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.08 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.05 g
<b>Medium</b>	<b>per litre</b>
Stock solution 1	100.0 ml
Stock solutions 2 - 8	10.0 ml each
Stock solution 9	1.0 ml

Make up to 1 litre with deionized water. Adjust pH to 7.1 with 1M NaOH or HCl. For agar add 15.0 g per litre of Bacteriological Agar (Oxoid L11)\*. Autoclave at 15 psi for 15 minutes.

### Medio de cultivo Blue-Green 11

Fuente: (Culture Collection of Algae and Protozoa, 2001)

- c) Colocar el volumen indicado en la ilustración 2 en un matraces de 1000 mL
  - d) En un matraz añadir 50 mL del cultivo de *Chlorella vulgaris* y en el otro matraz añadir 50 mL del cultivo de *Scenedesmus*
  - e) Realizar los cálculos para un volumen de 7.5 L por especie, preparar la solución, inocular con las microalgas y verter a los tubos de acrílico del equipo.
2. Regular el pH en una rango [7.5-8]
    - a) Lavar correctamente el pH-metro con agua destilada
    - b) Introducir el electrodo
    - c) Registrar el valor de pH inicial
    - d) Añadir unas pocas gotas de solución de HCl 2.0 N si el pH es mayor a 8.01 ó añadir KOH 30% (p/v) si la solución es inferior a 7.49
    - e) Registrar el pH final
  3. Distribuir en 3 matraces de 500 mL, rotulados previamente 250 mL de la solución preparada
  4. Colocar los matraces entre las lámparas del área de ensayos y asegurar la parte superior con un tapón de algodón.
  5. Agitar manualmente las muestras cada día para evitar sedimentación.

Determinación de la Concentración [ $\times 10^4$  células/mL]

- a) Utilizar la siguiente curva de calibración para determinar la concentración de las microalgas:  $\text{Conc} (\times 10^4 \text{ cel/ml}) = 5209.4 \cdot \text{Abs} - 70.67$