



UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA DE INGENIERIA CIVIL

***“AUTOMATIZACIÓN DEL ENSAYO DE RESPIROMETRÍA PARA
CARACTERIZACIÓN BIOCINÉTICA DE MICROORGANISMOS”***

Tesis de grado previo al Título de: **Ingeniera Civil**

Autora:

Mariela Fernanda Rojas Merchán

Director:

Ing. Andrés Alvarado Martínez, PhD.

Cuenca, abril del 2015



RESUMEN

El tratamiento de aguas residuales está compuesto de una serie de procesos físicos, químicos y biológicos. Dentro del tratamiento de aguas residuales, implica el desempeño biológico de microorganismos; por lo que resulta primordial entender estos mecanismos debido a que son parte clave del proceso. El consumo de oxígeno de los microorganismos está directamente relacionado al crecimiento de biomasa y además con la degradación del sustrato. La respirometría es una técnica basada en la medición e interpretación del consumo de oxígeno, y de todos los parámetros involucrados en las relaciones funcionales que están vinculadas ya sea directa o indirectamente con el balance de oxígeno, siempre que las condiciones experimentales se encuentren definidas y controladas. Debido a que la respirometría es una técnica rápida y de costo accesible, es ampliamente utilizada para la caracterización de aguas residuales y de lodos activos. En la presente investigación se desarrolló la configuración y la automatización del ensayo de respirometría y titulación, se realizó experimentos para la obtención de los parámetros biocinéticos de las microalgas *Chlorella*, *Scenedemus* y F.F Especie 1. Los experimentos se desarrollaron con la adición controlada de una fuente de carbono, para consecuentemente obtener un cambio en el balance de oxígeno. En consecuencia, los resultados de esta investigación son valiosos para una mejor comprensión sobre el desempeño de las microalgas en lagunas de estabilización, pudiéndose ser utilizados para mejorar el diseño y el control de los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Palabras Clave: respirometría, microalgas, lagunas de estabilización, tratamiento de aguas residuales, parámetros biocinéticos.



ABSTRACT

Wastewater treatment consists of a series of physical, chemical and biological processes. Wastewater treatment involves the biological performance of microorganisms; so it is crucial to understand these mechanisms because they are a key part of the process. Oxygen consumption of microorganisms is directly related to the growth of biomass and with the further degradation of the substrate. Respirometry is a technique based on the measurement and interpretation of oxygen consumption, and the parameters involved in the functional relationships that are linked over the long term are directly or indirectly correlated with the oxygen balance, provided that the experimental conditions are defined and controlled. Because respirometry is a fast and affordable technique, it is widely used for the characterization of sewage and activated sludge. In this research setting and respirometry –titrimetric test automation processes, developed experiments to obtain the biokinetic parameters of microalgae *Chlorella*, *Scenedesmus* and FF species 1. These experiments were carried out with the controlled addition of a carbon source, to obtain a change in the oxygen balance as a result. Consequently, the results of this research are valuable for a better understanding of the performance of microalgae in stabilization ponds, being able to be used to improve the design and control of systems for wastewater treatment.

Keywords: respirometry, microalgae, stabilization ponds, wastewater treatment, biokinetic parameters



TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
TABLA DE CONTENIDO	4
AGRADECIMIENTO	12
DEDICATORIA	13
CAPITULO 1	14
1. INTRODUCCION	14
1.1 Antecedentes	15
1.2 Justificación	16
1.3 Objetivos	16
1.3.1 Objetivo General	16
1.3.2 Objetivos Específicos	17
1.4 Descripción General	17
CAPITULO 2	19
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 Tratamiento Natural de Aguas Residuales	19
2.1.1 Clasificación de los Sistemas Naturales de Depuración	19
2.1.1.1 Sistemas Acuáticos	19
2.1.1.2 Tratamiento mediante aplicación en el terreno	21
2.2 Lagunas de Estabilización	23
2.2.1 Introducción	23
2.2.2 Sistema de lagunas de Estabilización	23
2.2.3 Procesos microbiológicos en lagunas de estabilización	27
2.3 Ensayo de Respirimetría	33
2.3.1 Introducción	33
2.3.2 Clasificación de los respirómetros	34
2.3.3 Factores que influyen en la productividad de las algas	36



CAPITULO 3	39
3. MATERIALES Y METODOS	39
3.1 Introducción	39
3.2 Fotobioreactores.....	39
3.4 Automatización del ensayo de respirometría en LabView	43
3.4.1 Componentes del Respirómetro.....	43
3.4.2 Titulación	47
3.4.3 Descripción de Hardware	48
3.4.4 Descripción de Software.....	49
3.5 Métodos empleados para la determinación de constantes cinéticas de las microalgas.....	56
3.5.1 Producción de Oxígeno y tasa de transferencia de Oxígeno	56
3.5.2 Sistema de Carbono.....	58
3.5.3 Respiración y Producción.....	58
3.5.4 Protocolo de respirometría.....	59
3.5.5 Determinación de la concentración de algas.....	60
3.5.6 Tasa de adición de Protones.....	62
CAPITULO 4	64
4. RESULTADOS Y DISCUSION	64
4.1 Introducción	64
4.2 Resultados Respirométricos	64
4.2.1 Determinación de la Constante de Tiempo del Electrodo de Oxígeno Disuelto.....	64
4.2.2 Obtención de Parámetros cinéticos de la familia Chlorella.....	66
4.2.3 Resultados de la familia Scenedesmus.....	71
4.2.4 Influencia de la cantidad de luz	77
4.2.5 Resultados de la Especie 1	81
4.3 Comparación de Resultados entre las microalgas Chlorella, Scenedesmus y FF Especie #1.....	85
4.4 Relación entre Turbiedad y concentración de peso Seco de microalgas.	87
CAPITULO 5	91
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	91



REFERENCIAS	93
ANEXOS	96

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 2.1 Mutualismo en las lagunas facultativas y de maduración (Mara, 2003)</i>	24
<i>Figura 2.2 Zonas de la laguna Facultativa, adaptado de Alvarado (2014)</i>	25
<i>Figura 2.3 Representación del crecimiento de microalgas. 1.-Fase de Adaptación; 2.- Fase Exponencial; 3.- Fase de declinación relativa del crecimiento; 4.- Fase Estacionaria; 5.- Fase de muerte</i>	31
<i>Figura 2.4 a) Respirómetro Estático y b) Respirómetro Dinámico</i>	34
<i>Figura 2.5 Luz – respuesta de fotosíntesis. (Richmond, 1988)</i>	36
<i>Figura 3.1 Fotobioreactores implementados en el laboratorio, con los respectivos sensores de oxígeno y pH</i>	40
<i>Figura 3.2 Balanza de precisión Excellence Analytica Balances</i>	41
<i>Figura 3.3 Cápsula de vidrio</i>	41
<i>Figura 3.4 Microscopio</i>	41
<i>Figura 3.5 Reactor Ensamblado incluye: Compresor de aire, Sistema de Agitación, Lámparas fluorescentes.</i>	44
<i>Figura 3.6 Materiales usados dentro de la configuración del respirómetro: a) reactor cilíndrico. b) Luxómetro. c) Sensor de pH YSI 4110. d) Sensor de oxígeno disuelto. e) Sensor de pH</i>	45
<i>Figura 3.7 Esquema de un respirómetro automatizado (Janssens, 2010).</i>	46
<i>Figura 3.8 Bomba Peristáltica Minipuls 3 GILSON</i>	47
<i>Figura 3.9 Interfaz gráfica del ensayo de respirometría</i>	50
<i>Figura 3.10 Adquisición de datos de oxígeno disuelto, temperatura y presión.</i>	51
<i>Figura 3.11 Automatización para el control de encendido de luces</i>	52
<i>Figura 3.12 Automatización de la dosificación de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.</i> 53	
<i>Figura 3.13 Contador de la cantidad de ácido y base</i>	54
<i>Figura 3.14 Automatización de la adquisición de datos</i>	55
<i>Figura 3.15 Centrifuga “Heraeus Megafuge 8”</i>	60



<i>Figura 3.16 a) Bomba de vacío b) Embudo de porcelana c) Filtros Whatman (ϕ 110mm)</i>	61
<i>Figura 3.17 Turbidímetro Turb 555</i>	62
<i>Figura 4.1 Curva obtenida en un experimento para determinar la constante de tiempo del electrodo de OD</i>	65
<i>Figura 4.2 Resultado de un ensayo de respirometría con la familia Chlorella</i>	67
<i>Figura 4.3 Resultado de la Curva respirométrica 1.003gr de NaHCO_3; 51.67 mg DW.l⁻¹</i>	68
<i>Figura 4.4 OTR del experimento mostrado en la Figura 4.3</i>	69
<i>Figura 4.5 Resultado de Respirometría y Titulación de un Experimento aplicado en la familia Chlorella</i>	71
<i>Figura 4.6 Resultado del ensayo de Respirometría aplicado a la familia Scenedesmus</i>	72
<i>Figura 4.7 Resultado de Curva respirométrica de microalga Scenedesmus: 1.002gr de NaHCO_3; 344.33 mg DW/l</i>	73
<i>Figura 4.8 OTR del experimento de respirometría de la Figura 4.7</i>	74
<i>Figura 4.9 Resultado de Respirometría y titulación aplicado a la familia Scenedesmus</i>	75
<i>Figura 4.10 Resultado de respirometría con diferentes cantidades de bicarbonato y una cierta cantidad de microalgas</i>	77
<i>Figura 4.11 Influencia de la cantidad de luz con la misma cantidad de bicarbonato</i>	78
<i>Figura 4.12 Influencia de la cantidad de biomasa</i>	80
<i>Figura 4.13 Resultado de Respirometría aplicado a la Especie 1</i>	81
<i>Figura 4.14 Resultado de Curva respirométrica de microalga FF Especie 1: 0.7501gr de NaHCO_3; 74.50 DW mg/l</i>	82
<i>Figura 4.15 OTR del experimento de respirometría de la Figura 4.12</i>	83
<i>Figura 4.16 Ejemplo de Respirometría y Titulación de la especie # 1</i>	84
<i>Figura 4.17 Concentración de Oxígeno Disuelto medido en varias familias de microalgas</i>	86
<i>Figura 4.18 Concentración de algas familia Chlorella vs Turbiedad</i>	88
<i>Figura 4.19 Concentración de algas de la Familia Scenedesmus vs Turbiedad</i>	89
<i>Figura 4.20 Concentración de algas de la Especie 1 vs Turbiedad</i>	90



LISTA DE TABLAS

Tabla 2-1	Tabla demostrativa del proceso en las lagunas de estabilización (Mara, 2013).	27
Tabla 2-2	Ejemplos de géneros de algas presentes en las lagunas facultativas y de maduración (Alvarado, 2013).....	32
Tabla 3-1	Resumen de los componentes de la configuración del hardware	49
Tabla 4-1	Valores calculados de la constante de tiempo del electrodo de Oxígeno Disuelto	65
Tabla 4-2	Resumen de los datos Calculados de la Figura 4.3 de respirometría	70
Tabla 4-3	Resumen de los datos Calculados de la Figura 4.7 de respirometría	74
Tabla 4-4	Resumen de los Valores del experimento de Titulación en la microalga Scenedesmus.	76
Tabla 4-5	Resumen de valores obtenidos a partir de los datos de respirometría de la figura 4.10.	77
Tabla 4-6	Resumen de cálculos de la influencia de la cantidad de luz.	79
Tabla 4-7	Resumen de cálculos de la influencia de la cantidad de biomasa	80
Tabla 4-8	Resumen de los datos Calculados de la Figura 4.14 de respirometría	83
Tabla 4-9	Resumen de los Valores del experimento de Titulación en la Especie #1	85
Tabla 4-4-10	Resumen de los datos calculados del perfil respirométrico de la Figura 4.15.....	87
Tabla 4-4-11	Resumen de las funciones de correlación de las especies analizadas.	90



LISTA DE SIGLAS

ASM3	Activated sludge model no.3
BOD	Demanda Biológica de Oxígeno
BSAR	Tasa de adición de protones de fondo
DAQ	Tarjeta de Adquisición de datos
OD	Oxígeno Disuelto
DW	Peso Seco
HAR	Tasa de adición de protones
IWA	Asociación Internacional de Agua " <i>International water association</i> "
K_{La} :	Punto de la curva de DO en el que el recurso de carbono es consumido completamente.
NC	Normalmente Cerrada
NO	Normalmente Abierta
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
OCD	Densidad optima de Celular
OPR	Tasa de producción de oxígeno
OTR	Tasa de transferencia de oxígeno
PFD	Densidad de flujo de fotones " <i>Photon flux density</i> "
PO_2	Actividad fotosintética
$PO_{2,max}$	Máxima actividad fotosintética
SS	Sólidos suspendidos
SSF	Sólidos suspendidos fijos
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TPAR	Tasa total de adición de protones
VI	Virtual Instrument



WSP

Lagunas de Estabilización “*Waste stabilisation pond*”



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Yo, Mariela Fernanda Rojas Merchán autora de la tesis “AUTOMATIZACIÓN DEL ENSAYO DE RESPIROMETRÍA PARA CARACTERIZACIÓN BIOCINÉTICA DE MICROORGANISMOS”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniera Civil. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 08 de abril del 2015



Mariela Fernanda Rojas Merchán

C.I: 0105949945



Yo, Mariela Fernanda Rojas Merchán, autora de la tesis "AUTOMATIZACIÓN DEL ENSAYO DE RESPIROMETRÍA PARA CARACTERIZACIÓN BIOCINÉTICA DE MICROORGANISMOS", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 08 de abril del 2015

Mariela Fernanda Rojas Merchán

C.I: 0105949945



AGRADECIMIENTO

Quiero dejar constancia de mi agradecimiento al Ing. Andrés Alvarado, director de la presente tesis, por su disposición, paciencia y confianza brindaba a lo largo del desarrollo del presente proyecto.

A la Dra. Guillermina Pauta por el apoyo y sus aportes brindados para la realización de la presente investigación. Al personal del laboratorio de sanitaria de la Facultad de Ingeniería, por la colaboración que me fue brindada.

A mis amigos, que dedicaron tiempo y esfuerzo para poder llegar culminar con éxito el presente trabajo.

Finalmente agradezco a los profesores de la Facultad de Ingeniería, que nos prepararon y capacitaron para nuestra formación profesional.

Mariela Fernanda Rojas Merchán



DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a Dios, por ser mi fortaleza y cimiento en todas las dificultades, presentadas, y por permitirme alcanzar este logro.

A mis queridos padres, quienes con su amor y sabiduría, han guiado y acompañado en todo momento, para el logro de mis distintos objetivos. Y que con su ejemplo de esfuerzo y superación diaria, me han inculcado a alcanzar mis objetivos.

A mis hermanas Marcia y Diana, a mi hermano Jerson, por su apoyo, cariño y alegrías que me supieron brindar y que llenaron mis días de sonrisas. A Mauricio por su apoyo incondicional y el ánimo brindado. Y todas las personas que de una u otra forma estuvieron pendientes y confiaron en mí.

Mariela Rojas



CAPITULO 1

1. INTRODUCCION

El agua es uno de los recursos naturales que forma parte del desarrollo de cualquier país; es el compuesto químico más abundante del planeta y resulta indispensable para el desarrollo de la vida (Romero, 2009). Su disponibilidad se ve limitada cada día debido a su contaminación por diversos medios.

Se refiere al agua contaminada, cuando están alteradas sus características químicas, físicas, biológicas o la composición de cada una de ellas, con lo que pierde su potabilidad para consumo diario o se limita su utilización en actividades domésticas, industriales o agrícolas. En consecuencia las actividades humanas en general de manera inevitable modifican el agua de abastecimiento convirtiéndola en aguas residuales.

La mayoría de vertidos de aguas residuales en América Latina que se generan en asentamientos humanos, no son tratados, es decir que la descarga se realiza de manera directa al río, mar o cuerpo receptor más cercano al lugar de procedencia, dejando que los sistemas naturales sean los encargados de degradar los desechos que se encuentran en las aguas residuales(Unicef, 2008).

Se tiene de esta manera que el vertido de aguas residuales no tratadas constituye un riesgo en la salud pública y el medio ambiente. Por lo tanto, casi siempre el agua residual debe ser tratada con el fin de reducir la transmisión de enfermedades relacionadas con las excretas, reducir la contaminación del agua y el consecuente daño de la vida acuática(Mara, 2003).

En los países en vías de desarrollo solo una pequeña porción de agua residual producida por comunidades con alcantarillado es tratada. El acceso al agua y al saneamiento está aún lejano de cumplir con los objetivos de desarrollo del Milenio, solo el 77% de la población cuenta con saneamiento adecuado según la OMS y la UNICEF (2004) además que, únicamente el 10% de las aguas residuales tienen algún tipo de tratamiento previo a su descarga.



1.1 Antecedentes

El tratamiento de aguas residuales está compuesto de una serie de procesos físicos, químicos y biológicos con el fin de minimizar los riesgos para el medio ambiente. El tratamiento natural de aguas residuales o llamado también tecnologías no convencionales de tratamiento son una alternativa viable para el tratamiento de aguas residuales para pequeñas poblaciones. Su versatilidad y adaptabilidad, su integración en el entorno y su menor costo de implantación y explotación hacen especialmente indicadas para la depuración de los efluentes de aguas residuales (2008).

En el Ecuador también se han aplicados técnicas de depuración natural. El ejemplo pionero en el país es la planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba ubicado al norte de la ciudad de Cuenca. La misma que trata el 95% de las aguas residuales de la ciudad, a través de estructuras de tratamiento preliminar y 6 lagunas de estabilización: 2 Aereadas, 2 facultativas y 2 de maduración. Siendo parte principal del proceso en las lagunas facultativas la presencia de microalgas que son las principales suministradoras de oxígeno disuelto ofreciendo así un paso más allá en los tratamientos de aguas residuales, ya que utilizan el nitrógeno y fósforo contenido para su crecimiento, es un Bio-tratamiento terciario junto con la producción de biomasa algal, que se puede utilizar en varios propósitos (Mendoza, 2000).

Las microalgas presentes en las lagunas de estabilización pueden variar según las distintas condiciones presentes a lo largo de la línea de tratamiento. Existe una amplia diversidad de especies de algas y cyanobacterias en los sistemas de tratamiento lagunar. Dentro de estos se pueden encontrar los principales tipos de encontradas en los sistemas de tratamiento lagunar son: Euglenophyta, Cryptophyta, Chlorophyta, Chrysophyta y las cianobacterias, las cuales se encuentran ampliamente en dichas lagunas (Janssens, 2009).



1.2 Justificación

El tratamiento de aguas residuales, implica en una gran medida el metabolismo biológico de microorganismos; por lo que resulta primordial entender estos mecanismos que son quienes realizan una parte clave del proceso (Rodríguez, 2009). Además, cuando se aplican procesos biotecnológicos en el tratamiento de efluentes (por ejemplo, lodos activados, biofiltros, fermentadores, etc.), la caracterización de la biomasa en términos de la caracterización de parámetros biocinéticos es de crucial importancia para el diseño y la optimización de sistemas (Decostere & Janssens, 2013)

La presente investigación, se enfoca en el desarrollo de una de las técnicas más fiables para entender y cuantificar el metabolismo de organismo aerobios que es la respirometría. Para este fin, se ha realizado el diseño y la programación de un sistema experimental automatizado de respirometría para la obtención de parámetros biocinéticos en microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual. El empleo de una técnica específica para adquirir los parámetros biocinéticos de microalgas mejoraría sustancialmente la modelización de procesos de algas debido a que actualmente los parámetros disponibles en la literatura cubren una amplia gama de (Janssens, 2010) .La técnica de la respirometría que es ampliamente utilizada para la caracterización de aguas residuales y de lodos activados además de ser una técnica rápida y de costo accesible.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Contribuir al conocimiento científico y práctico respecto de las microalgas presentes en varios sistemas naturales.



- Incorporar conocimiento científico y experimental al Laboratorio de Sanitaria de la Facultad de Ingeniería.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Automatizar el ensayo experimental de respirometría a escala de laboratorio.
- Diseñar y programar un procedimiento experimental automatizado para la obtención de parámetros biocinéticos en microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual mediante la técnica de respirometría.

1.4 Descripción General

La presente tesis inicia con una introducción general de los sistemas de tratamiento de aguas residuales y con los objetivos para el presente proyecto de investigación. En el capítulo 2 se presenta una revisión de la literatura basada en los procesos microbiológicos que se desarrollan en las lagunas de estabilización y esencialmente en el ensayo de respirometría, y los parámetros biocinéticos que se pueden obtener de la implementación y automatización del respirómetro a escala de laboratorio. El capítulo 3 se detalla la configuración para la automatización del ensayo de respirometría a través del Software LabView, así como también cada uno de los procesos y materiales empleados en la experimentación de las diversas especies de microalgas, para la obtención de los parámetros biocinéticos de las microalgas en investigación. En el capítulo 4 se presentan los resultados e interpretación de las experimentaciones tanto de respirometría como de titulación que fueron desarrolladas.



Finalmente en el capítulo 5 se presentan las conclusiones más importantes de la presente investigación y recomendaciones para futuras aplicaciones del ensayo de respirometría que podrían ser tomadas en consideración. En última instancia se presenta las referencias y anexos utilizados para el desarrollo de la presente tesis.



CAPITULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Tratamiento Natural de Aguas Residuales

Los procedimientos naturales de tratamiento de aguas residuales consisten en la eliminación de distintos contaminantes presentes valiéndose de algunos componentes proporcionados por el medio natural; es decir, sin la utilización de algún aditivo químico durante todo el proceso. En las técnicas naturales el efecto de depuración se debe a la acción vegetal, suelo y microorganismos.

Los tratamientos naturales además se caracterizan por que las necesidades operacionales son menores, es decir hay un menor consumo energético. Una desventaja de estos sistemas, sin embargo, es que requieren de una gran cantidad de terreno disponible, en comparación con las requeridas por las tecnologías convencionales por lo que se convierte en un factor limitante, especialmente en pequeñas poblaciones.

2.1.1 Clasificación de los Sistemas Naturales de Depuración

- Sistemas Acuáticos
- Tratamiento mediante aplicación en el terreno.

2.1.1.1 Sistemas Acuáticos

Son desarrollados en medios acuáticos junto a microorganismos que logran transformar los contaminantes del agua a través de procesos físicos, químicos y biológicos como son: sedimentación, oxidación, fotosíntesis, digestión, aireación y evaporación. (Valencia, 2013)

Dentro de los sistemas acuáticos se encuentran los siguientes métodos:



- **Lagunares**

Consiste en el almacenamiento de agua residual a tratar durante periodos de tiempo suficientemente largos y variables. De tal forma en que se produzca la oxidación de la materia orgánica del agua residual mediante la actividad microbiana presente en el medio acuático. Los sistemas lagunares se clasifican en:

- Lagunas Anaerobias
- Lagunas Facultativas
- Lagunas Aereadas Facultativas
- Lagunas de Maduración (Aerobias)

- **Humedales**

Son sistemas en los que el agua está fluyendo continuamente, la superficie libre permanece al nivel del suelo, de esta forma manteniéndolo en estado de saturación durante largos periodos. Son terrenos inundados de profundidad menor a 0.6 m, estos también tienen su clasificación y son:

- Humedales artificiales
- Humedales naturales

Suelen tener una base impermeable, sobre esta base se deposita un lecho de gravas, suelo u otro medio para el desarrollo de plantas, que es el principal funcionario depurador.

- **Cultivos Acuáticos**

Los cultivos acuáticos son una variante del humedal artificial, en el que se introduce un cultivo de plantas flotantes, siendo el principal objetivo la eliminación de ciertos componentes del agua residual, a través de sus raíces. Las plantas flotantes evitan la entrada de la luz solar al humedal. Lo cultivos



acuáticos han sido de gran utilidad para la producción de proteínas y biomasa, siendo así la depuración un objetivo secundario.

Su profundidad varía entre 0.5 a 1,8m y suelen utilizarse para el tratamiento terciario.

2.1.1.2 Tratamiento mediante aplicación en el terreno

Se desarrolla a través de la combinación de procesos físicos, químicos y biológicos desarrollados en un sistema planta, suelo y agua: filtración, intercambio iónico, precipitación, fenómenos de óxido-reducción, degradación de la materia.

Podemos encontrar los siguientes métodos:

- **Filtro Verde:**

Consiste en la aplicación del caudal de agua residual sobre una superficie extensa de terreno donde previamente ha sido instalado un cultivo pudiendo ser este una masa forestal, para esta técnica es necesario un gran espacio disponible de terreno y se utiliza en poblaciones inferiores a 25000 habitantes.

La depuración se consigue de manera conjunta con el suelo, microorganismos y los cultivos mediante procesos físicos (filtración), químicos (intercambio iónico, precipitación, fenómenos de óxido-reducción) y biológicos (degradación de la materia orgánica), siendo estos capaces de eliminar hasta cierto punto los contaminantes del agua residual alcanzando una depuración de hasta el 98% en los horizontes superiores del terreno, en la capa biológica activa (2008).

Debido a que debe existir un cultivo anticipado no solo se consigue la depuración del efluente si no el crecimiento de especies vegetales. Las áreas forestales, constituyen un potencial para reciclar los nutrientes en especial los contenidos en las aguas residuales, resultando un eficiente método de reducción de la emisión de contaminantes al medio con el incremento en la producción de madera, biocombustibles, etc. (Alvarez, 2002)



- **Infiltración rápida**

Este método es conocido con RI (*Rapid Infiltration*), consiste en la aplicación de manera controlada de agua residual sobre balsas superficiales construidas sobre suelos que tengan una permeabilidad media a alta. La aplicación se da en forma cíclica, de esta manera se permite la regeneración aerobia de la zona de infiltración es decir en las primeras capas del sustrato filtrante, manteniendo así la máxima capacidad del tratamiento. La infiltración rápida exige mantenimiento periódico de la superficie, y es aplicable para poblaciones menores a 5000 habitantes. (Mantecón, 1991). La depuración se produce por procesos físicos, químicos y biológicos, producidos cuando el agua residual atraviesa la zona no saturada. Se logra alcanzar una reducción a la mitad de DBO5 y sólidos en suspensión alrededor del 90%, y eliminación de patógenos entre el 70% y 90% (por el Agua, 2008).

- **Infiltración lenta**

Es designado por las letras SR (slow rate), se realiza mediante la aplicación de un caudal de agua residual sobre el terreno cubierto de cultivos, pueden operar en ciclos semanales. Luego de la infiltración, el agua residual desciende verticalmente y de manera lateral a través del suelo. La cubierta vegetal es importante en el proceso de tratamiento, ya que su selección y cuidado depende del grado de tratamiento que se requiera. La infiltración lenta tiene mayor potencial de depuración de aguas residuales, ya que se aplican cargas bajas sobre un suelo con vegetación, y por encontrarse un ecosistema activo inmediatamente después de la superficie.



2.2 Lagunas de Estabilización

2.2.1 Introducción

Desde XIX se han utilizado sistemas de lagunas de estabilización (WSP) en varios países de América Latina, siendo un sistema de tratamiento biológico de mucha utilidad en el tratamiento de agua residual especialmente en el sector rural (Rengel, 2000). Con dichas lagunas se busca proteger la calidad de agua en los ríos y en cuerpos receptores.

La principal característica de las lagunas de estabilización, es la facilidad de construcción y un mantenimiento mínimo. Además de ser un sistema confiable, sin la necesidad de una fuente externa de energía. Otra de las ventajas de las lagunas de estabilización es que logran efluentes de calidad microbiológica adecuada, sin la necesidad de recurrir a la desinfección, esto debido a la presencia de microalgas, que además son muy apreciados por los agricultores por su gran contenido de nutrientes (Yáñez, 1993), es decir se tratan efluentes de tipo domésticos e industriales, sirviendo para poblaciones pequeñas o grandes.

Este tipo de sistema se desenvuelve mejor en climas cálidos, aunque ha dado excelentes resultados en climas templados, por lo que se concluye que puede ser empleado en un amplio rango de condiciones climáticas.

2.2.2 Sistema de lagunas de Estabilización

Lagunas de estabilización (WSP) está compuesto por la combinaciones de lagunas esto depende de las condiciones en las cuales se desarrollara y del objetivo del tratamiento es decir del tipo de tratamiento que se requerirá, las principales son: lagunas anaerobias, facultativas y de maduración, aunque puede existir unas

variantes como la laguna aireadas o una combinación como: las lagunas aireadas facultativas.

Las lagunas anaerobias y las facultativas con las encargadas de la remoción de la DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno), mientras que las lagunas de maduración son las encargadas de la remoción de bacterias fecales como son los huevos de helmintos, también de la remoción de algunos nutrientes como el nitrógeno y fósforo.

Las lagunas facultativas y de maduración son lagunas de fotosíntesis, ya que en estas las bacterias consumen el oxígeno producido por las microalgas que crecen naturalmente en estas lagunas y que le dan el característico color verde; mientras que las algas consumen el dióxido de carbono que es el producto final emanado por las bacterias. Convirtiéndose en una relación “mutualista” entre estos dos organismos (Mara, 2003) (Ver Fig. 2.1).

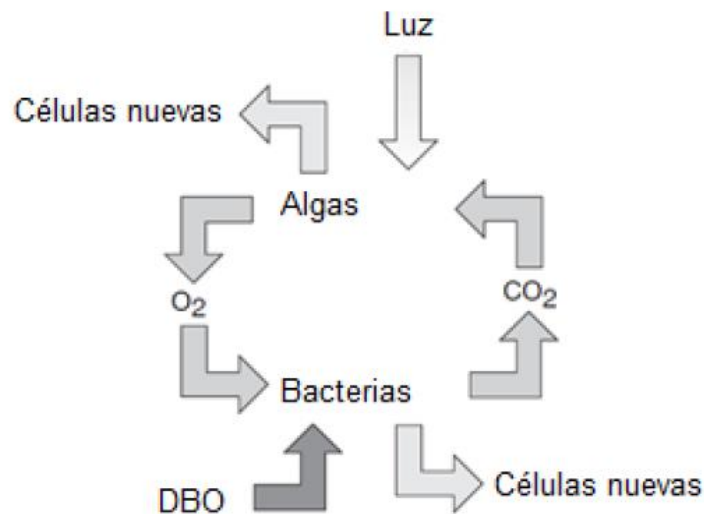


Figura 2.1 Mutualismo en las lagunas facultativas y de maduración (Mara, 2003).

Clasificación de las lagunas de Estabilización:

• Lagunas Anaerobias

Por lo general es el primer tipo de las lagunas en serie. La profundidad de este tipo de lagunas varía entre 2-5m y están diseñadas para cargas orgánicas altas, (por lo general entre $100\text{g DBO}/\text{m}^3 \text{ día}$), este tipo de lagunas no presentan oxígeno disuelto ni algas. La función de las lagunas anaerobias es semejante a la de un tanque séptico, siendo su principal función la remoción de DBO, llegando a alcanzar una remoción de hasta el 60%. La remoción de la DBO se consigue debido a la sedimentación de sólidos y su posterior digestión anaerobia, resultando una capa de lodo densa, que produce alrededor del 70% de metano y un 30% de dióxido de carbono. Debido a que algunos componentes de las aguas residuales sobre todo industriales, resultan tóxicos para las algas, es muy común ubicar previo a las lagunas facultativas y de maduración a lagunas anaerobias.

• Lagunas Facultativas

Las lagunas facultativas son las más importantes en un tratamiento de lagunas de estabilización, y cuya finalidad es la estabilización de la materia orgánica en un medio oxigenado proporcionado por las microalgas presentes. El término facultativo hace referencia a que dicha laguna consiste de 3 zonas diferenciadas: aerobia, anaerobia y la zona facultativa. (Ver Fig. 2.2).

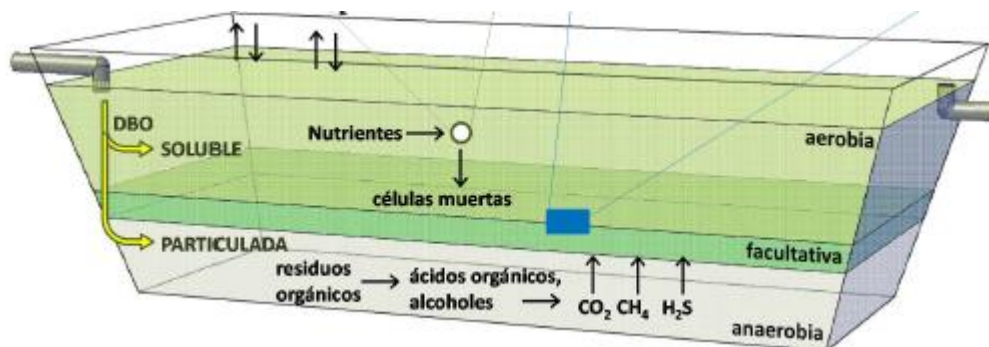


Figura 2.2 Zonas de la laguna Facultativa, adaptado de Alvarado (2014)



En la parte inferior de la laguna se presenta la zona anaerobia, mientras que en la parte superior de la laguna, evidentemente la zona aerobia. En esta zona, existe una alta concentración de algas, las mismas que tienen la función de producir oxígeno a través del proceso de la fotosíntesis, que depende a su vez de la profundidad de la laguna y de la disponibilidad de la energía solar, ya que conforme se profundiza en la laguna se reduce la producción de oxígeno. Una característica de las lagunas facultativas es que su profundidad puede variar entre 1 y 1.8m, no son recomendables las profundidades menores a 1m ya que puede aparecer vegetación indeseable (Decostere & Janssens, 2013; Mara, 2013).

Las tres zonas no están permanentemente definidas en las lagunas facultativa esto se debe a que en el día y la noche se presentan variaciones en la disponibilidad de la luz, ya que en la noche no se da el proceso de fotosíntesis y por lo tanto la zona aerobia disminuye. Se demuestra esto por la concentración de oxígeno disuelto en el cual se puede apreciar que existe una variación siendo mínimo a la salida del sol y máximo en la mitad de la tarde y volviendo a ser mínimo durante la noche.

- **Lagunas de Maduración**

Las lagunas de maduración se utilizan como tratamiento terciario. Debido a que las lagunas reciben baja cantidad de nutrientes, su función principal es la reducción de organismos patógenos y la remoción de nutrientes como el nitrógeno y fósforo presentes en el efluente de las lagunas facultativas (Shilton, 2005).

Las lagunas de maduración son exclusivamente aerobias en toda su profundidad, no presentan ninguna estratificación como las facultativas, contienen una mayor diversidad de algas, pero de menos concentración que las lagunas precedentes.

Se diseña con profundidades menores a 1 m, ya que esto favorece la penetración de la luz, y así ocasionar daños en los organismos patógenos.



Parámetros (mg/l)	Agua Residual Cruda	Laguna Anaerobia	Laguna Facultativa	Laguna de maduración	Porcentaje acumulado removido %
BOD	240	63	45	17	93
Amonio-N	45	32	27	8	82
Fósforo	6,6	4	3,7	2,4	64
Coliformes Fecales	5×10^7	3×10^6	3×10^5	30	99,9999

Tabla 2-1 Tabla demostrativa del proceso en las lagunas de estabilización (Mara, 2013).

2.2.3 Procesos microbiológicos en lagunas de estabilización

2.2.3.1 Introducción

Las microalgas muestran una versatilidad que les permiten participar en diferentes procesos biotecnológicos, siendo uno muy importante el tratamiento de aguas residuales (Gonzales, 1997). En las lagunas facultativas y de maduración crecen las microalgas, y es por eso su color característico verde, estas con lagunas fotosintéticas, y es precisamente aquí donde se desarrolla el mutualismo (Mara, 2013).

Se están desarrollando sistemas de tratamiento de aguas residuales, basados en el cultivo de algas, esto resulta ser muy eficaz para la eliminación de Nitrógeno y Fósforo en tiempos muy cortos. (Lavoie, 1985)

Procesos Anaerobios

La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) que ingresa al sistema se sedimenta en el fondo de la laguna formando una capa anaerobia. La materia orgánica se somete a la digestión anaerobia y la metanogénesis por los microorganismos presentes. El carbono orgánico se convierte en dióxido de carbono. Los gases liberados en este proceso ayudan a la mezcla, incrementado el contacto entre el agua residual y la comunidad microbiana (Janssens, 2010).



La materia orgánica se convierte a una forma más oxidada como el CO_2 y en otra forma más reducida CH_4 . Sin embargo más de CH_4 se libera en la fase de gas, dando lugar a una efectiva remoción de la materia orgánica.

La conversión anaerobia ocurre en dos etapas:

La fase acidogénica: En este paso solo hay una conversión de la materia orgánica pero no su remoción. La Conversión de la materia orgánica en ácidos orgánicos producidos por organismos formadores de ácidos.

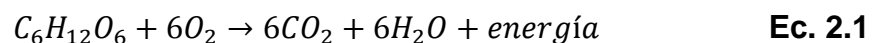
La fase metanogénica: La conversión de ácidos orgánicos en metano, dióxido de carbono y agua por organismos formadores de metano (Sperling, 2007).

Procesos Aeróbios

La DBO soluble y la pequeña materia orgánica suspendida permanecen en las capas superiores de la laguna. Las bacterias oxidan la materia orgánica por la respiración aerobia y las algas suministran el oxígeno con la ayuda de la fotosíntesis. (Ver Fig. 2.1)

La aeración de las lagunas depende de la actividad fotosintética de las algas. Al menos un 80% del oxígeno disponible en el agua es producido por algas. Y la actividad fotosintética depende de la cantidad de luz disponible. Es por este motivo que las zonas con alta tasa de radiación solar, son zonas donde es interesante y conveniente el tratamiento de aguas residuales a través de WSP (Henze, 2008).

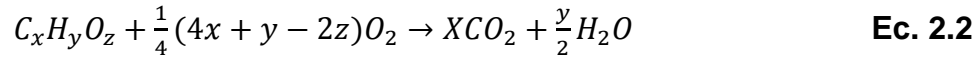
Ecuación de la oxidación de la glucosa:



De la ecuación se considera los siguientes aspectos: estabilización la materia orgánica, utilización de oxígeno, la producción de dióxido de carbono y la liberación de energía.



La ecuación puede ser expresada de una forma genérica (Yáñez, 1993):



Siendo los principales agentes responsables de la estabilización aerobia de la materia carbonácea contenida en las aguas residuales los organismos representados por bacterias heterotróficas facultativas y aerobias (Sperling, 2007)

2.2.4 Modelización de procesos de algas

Los procesos matemáticos pertenecientes a los procesos de algas en WSP son limitados. Los procesos de algas incluyen el crecimiento y el proceso de respiración que son implementados en los modelos. Las microalgas presentan en el sistema la siguiente consideración:



En estas reacciones las algas son representadas por la X, las cuales utilizan el sustrato de efluente (S_1) y el dióxido de carbono (CO_2) para el crecimiento. La decadencia o muerte de las microalgas produce materia insoluble.

La máxima tasa de crecimiento teórica debería ser igual a la máxima tasa de la fotosíntesis. Sin embargo la producción de las algas es a menudo limitada por la concentración de nutrientes, la intensidad de la luz, pH y la temperatura. Estos factores pueden influenciar directamente en la densidad de las algas. La tasa específica de crecimiento (μ) de los organismos es generalmente modelado por la



multiplicación de la máxima tasa de crecimiento ($\mu_{\text{máx.}}$) con algunos factores limitantes (f_i) (Janssens, 2010).

$$\mu = \mu_{\text{max}} * X * \prod_i f_i \quad \text{Ec 2.6}$$

La mayoría de los modelos para la fotosíntesis de microalgas solo tienen en cuenta la disponibilidad de la luz, pero debería ser tomado en consideración la disponibilidad de nutrientes y además el CO_2 siendo este el más importante.

Cinética del Crecimiento de las Algas

La cinética del crecimiento de microalgas tiene un patrón estándar de crecimiento consta de 5 fases:

La fase de **adaptación** en donde el número de células presentes no incrementa de forma visible, pudiendo llegar a disminuir su número con respecto al inóculo inicial, se sigue con la fase **exponencial**, esta ocurre una vez que se encuentran adaptadas al medio, las microalgas comienzan a multiplicarse continuamente en forma exponencial, su capacidad de división celular en esta fase es acelerada, a continuación la fase de **declinación relativa de crecimiento**, en esta fase se presenta una disminución de los nutrientes debido a la alta población de las microalgas, además en esta etapa se presenta alteraciones en el pH a consecuencia de la densidad de las microalgas, por este motivo la tasa de división celular disminuye, la siguiente fase es la **estacionaria**, las microalgas no presentan división celular neta, por lo que el número de células permanece constante en esta etapa, hay un balance entre la natalidad y mortalidad del cultivo, pueden durar varias semanas en esta fase para luego llegar a la etapa la **muerte** de las células. (Ver Fig. 2.3)

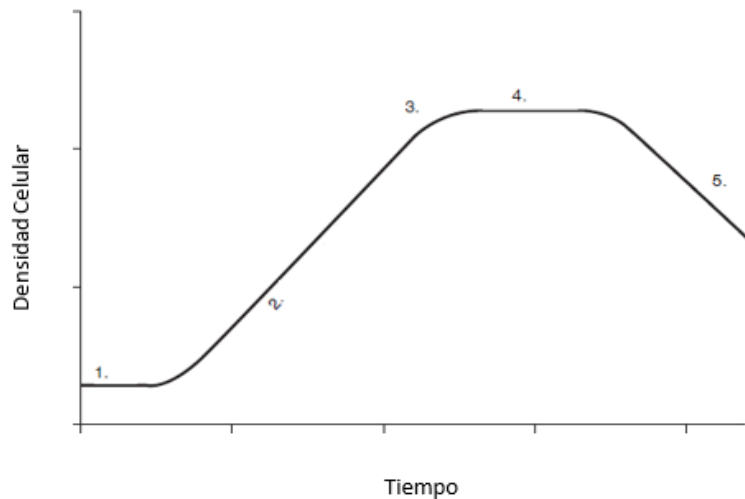


Figura 2.3 Representación del crecimiento de microalgas. 1.-Fase de Adaptación; 2.- Fase Exponencial; 3.- Fase de declinación relativa del crecimiento; 4.- Fase Estacionaria; 5.- Fase de muerte.

2.2.5 Diversidad de Algas

En las WSP existe una amplia gama de microalgas donde se destaca principalmente el alga verde (*Chlorophyta*), alga pigmentada (*Euglenophyta*) que son las responsables el color verde característico, y dentro de ésta predominan los géneros *Chorella* y *Chlamydomonas*.(Sperling, 2007). Las Cyanobacterias son organismos que no poseen sistema de locomoción como las anteriores, que si presentan flagelos utilizados para su movilización, pero aun así son capaces de moverse, pertenecen a la clasificación de las bacterias, aunque presentan características de algas y bacterias. Están presentes en lugares donde existe poca disponibilidad de nutrientes y donde el pH sea bajo. Las más importantes presentes en las lagunas de estabilización son: *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Anacystis* y *Anabaena* (Cabrera & Pulla, 2014; Sperling, 2007)

En la Tabla 2.-2, se puede observar los distintos géneros de algas presentes en las lagunas Facultativas y las Lagunas de maduración, aunque las especies pueden depender de la carga orgánica en la superficie de las lagunas, a mayor carga, menor diversidad de algas.



Género algal	Lagunas Facultativas	Lagunas de Maduración
<i>Euglenophyta</i>		
Euglena	+	+
Phacus	+	+
<i>Chlorophyta</i>		
Chlamydomonas	+	+
Chlorogonium	+	+
Eudorina	+	+
Pandorina	+	+
Pyrobotrys	+	+
Ankistrodesmus	-	+
Chlorella	+	+
Micractinium	-	+
Scenedesmus	-	+
Selastrum	-	+
Carteria	+	+
Coelastrum	-	+
Dictosphaerium	-	+
Oocystis	-	+
Rhodomonas	-	+
Volvox	+	-
<i>Chrysophyta</i>		
Navicula	+	+
Cyclotella	-	+
<i>Cyanobacteria</i>		
Oscillatoria	+	+
Arthrospira	+	+
Spirulina	-	+

Tabla 2-2 Ejemplos de géneros de algas presentes en las lagunas facultativas y de maduración (Alvarado, 2013).



2.3 Ensayo de Respirometría

2.3.1 Introducción

La respirometría es la medición e interpretación de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) por parte de microorganismos en condiciones experimentales, definidas y controladas. Un respirómetro es definido como el reactor biológico que está destinado a cuantificar “*oxygen uptake rate*” (OUR) que es definido como la cantidad de oxígeno consumida por litro de reactor y por unidad de tiempo (Guisasola, 2005). El ensayo de respirometría consta esencialmente en determinar los cambios que se produce en la velocidad de la respiración de los microorganismos, cuando estos son puestos a distintos experimentos. En los ensayos respirométricos se adquieren datos sobre el consumo de oxígeno en respuesta al metabolismo del sustrato, debido a la respiración de los microorganismos, con lo que proporciona valores de alta calidad para la respectiva estimación de parámetros biocinéticos.

La velocidad está relacionada con dos procesos bioquímicos importantes: crecimiento de la biomasa y consumo de sustrato. Dicha velocidad de respiración de los organismos (R_t) puede ser dividida en 2 tipos: velocidad de respiración endógena (R_{en}) y respiración exógena (R_{ex}). Si no existe ningún tipo de sustrato que sea oxidable, los microorganismos se encargan de oxidar su propia biomasa, con el fin de generar energía para las funciones de mantenimiento celular, con lo que se tiene: $R_t=R_{en}$. En el caso de que se agregue un sustrato determinado, los microorganismos lo oxidan y se produce un aumento en la velocidad del consumo de oxígeno; con lo que se tiene: $R_t=R_{en}+R_{ex}$.

2.3.2 Clasificación de los respirómetros

- **La International Water Association (IWA)**

Propone una clasificación con tres letras que indican tres parámetros básicos de funcionamiento. La **primera letra** indica si la medida de oxígeno que está siendo tomada se realiza en fase de gas (G) o líquida (L); La **segunda letra**, si la fase de gas trabaja o ingresa al reactor en condiciones estáticas “*Static*” (S) o de manera continua o en condiciones dinámicas “*Flowing*” (F); y la **tercera letra**, indica la manera que tiene la fase líquida de entrar al respirómetro, dinámico o continuo “*Flowing*” (F) y estático “*Static*” (S). (Ver **Figura 2.4**)

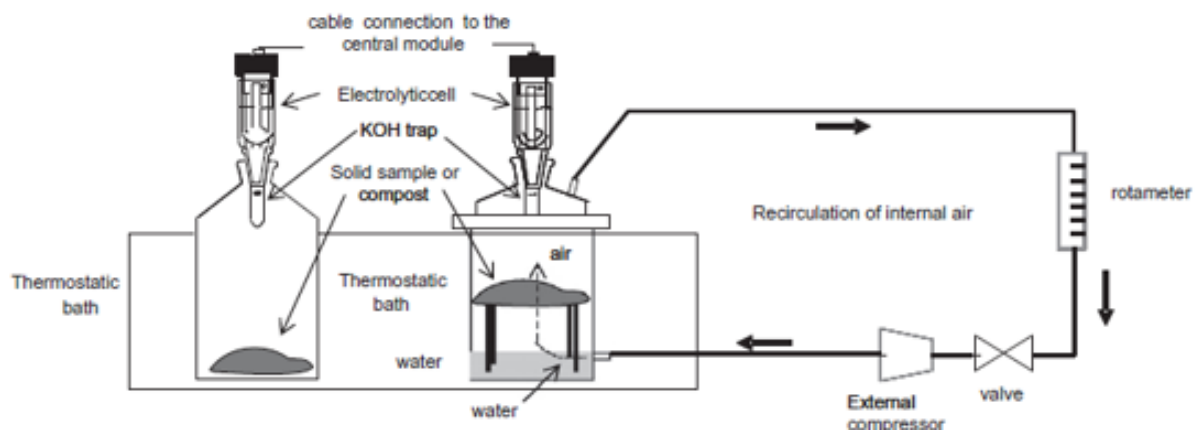


Figura 2.4 a) Respirómetro Estático y b) Respirómetro Dinámico

- Respirómetro con aireación continua (LSF)

Es un reactor biológico que no tiene entradas ni salidas, y que está constantemente aireado, y que la medición del oxígeno se realiza en la fase líquida. El aire entra en un caudal controlado y a través de un difusor especial, que provoca una buena eficiencia en la transferencia de oxígeno de la fase gas a la fase líquida. Finalmente,



debe controlarse el pH y el oxígeno conectado a un computador que monitorea constantemente y guarda los respectivos datos (Guisasola, 2005).

- Respirómetro continuo (GFS)

Hace referencia al modo de aporte del gas, es un respirómetro continuo debido a que la circulación de aire se da de manera ininterrumpida, es decir continua. Se mide a concentración de oxígeno a la entrada y a la salida del reactor, para así poder determinar el consumo de oxígeno a través de las variaciones de las velocidades instantáneas. Es de tipo GFS "*Gas Flowing Static*" porque la medida de oxígeno es en fase gas, el gas entra al respirómetro en forma continua y la fase líquida entra en forma estática.

- Respirómetro discontinuo (Batch):

Este tipo de respirómetro es denominado así porque el aporte de oxígeno depende de dos valores asignados, un máximo y un mínimo de concentración dentro del recipiente o reactor donde se esté llevando la respirometría. Se inyecta aire hasta alcanzar el valor máximo, se suspende la inyección y se espera a que los microorganismos consuman todo el oxígeno disponible, hasta llegar al valor mínimo, donde nuevamente se volverá a inyectar oxígeno. Se puede medir el tiempo que emplean los microorganismos en consumir el oxígeno, con lo que se obtiene la velocidad instantánea de consumo de oxígeno. Este respirómetro funciona como un GSS, si la medida de la concentración de oxígeno se hace en el gas, o un LSS, si la concentración de oxígeno se realiza en el medio líquido.

2.3.3 Factores que influyen en la productividad de las algas

Los principales factores son:

- Intensidad de la luz

Las microalgas son foto autótrofas encargadas de convertir la energía luminosa por medio de la fotosíntesis en metabólica, su exposición puede ser continua en el caso artificial o discontinua como luz natural en el ciclo día y noche. Como ya se mencionó anteriormente la luz es un factor importante ya que interviene en la fotosíntesis. La energía de la luz es recibida por los microorganismos y depende la densidad de flujo de fotones (PFD), estos alcanzan la superficie celular de las algas. Varias investigaciones han demostrado que a mayor intensidad de luz se incrementa la producción de oxígeno. La respuesta de la tasa de crecimiento de las algas aumenta junto con el aumento de la luz. (Janssens, 2010)

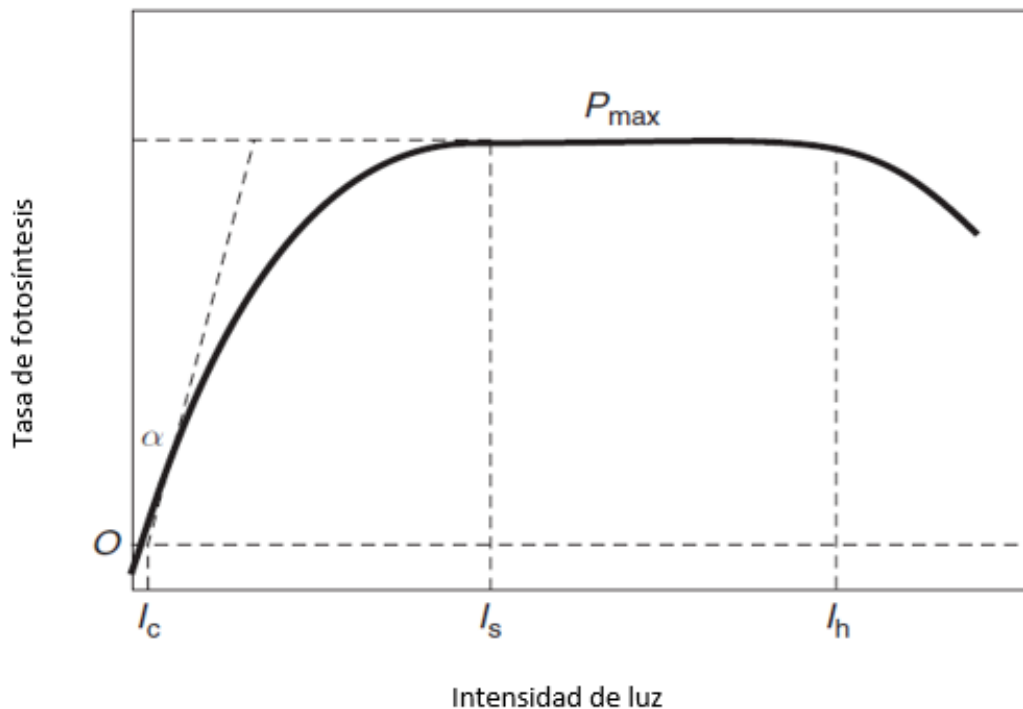


Figura 2.5 Luz – respuesta de fotosíntesis. (Richmond, 1988)



Bajas intensidades de luz da como resultado una baja tasa de crecimiento que es compensada con la tasa de decaimiento (punto de compensación I_c). Con un aumento de la intensidad de la luz la tasa de crecimiento de las algas es acelerada, el punto de saturación puede ser alcanzado (intensidad de saturación I_s). Si se continúa incrementando la intensidad de la luz por encima del punto I_h se provoca una disminución de la tasa de crecimiento ocasionando la muerte celular (Richmond, 1988).

- Concentración Celular

La tasa fotosintética puede variar de manera significativa, esto depende de varios factores uno de ellos es la alta densidad celular, esto puede alterar la disponibilidad de la luz debido al sombreado mutuo. Por lo tanto para una fuente de luz y la configuración de un reactor debería existir la densidad celular óptima (OCD) “*optimal cell density*” con lo que se tendría la producción fotosintética máxima. Este produce el rendimiento neto más alto de biomasa por unidad de superficie iluminada de volumen de reactor.

En cultivos con una muy baja densidad el rendimiento o la producción de las algas también puede estar por debajo de las máximas debido a que la intensidad de luz recibida es excedente lo que provoca una foto inhibición es decir inhibir el proceso normal de la fotosíntesis. En los cultivos mayormente densos la penetración de la luz se acorta, en la parte superior que está expuesta a la luz es suficientemente alta para la realización de la fotosíntesis o zona fotosintética, mientras que en la parte interior no se da la fotosíntesis neta ya que no hay la presencia de luz, y es ahí cuanto el sombreado mutuo es demasiado alto, es decir la luz disponible por capacidad de célula es escasa (Janssens, 2010).



- Agitación:

Asegura una distribución de la luz, es decir que todas las microalgas estén sometidas a la fotosíntesis, una homogenización de las células, el pH y los nutrientes dentro del cultivo, previniendo así la sedimentación de las mismas. Aunque existen ciertas especies que no toleran una agitación esto debido a que son sensibles al estrés hidrodinámico (Cabrera & Pulla, 2014).

- Temperatura:

Las microalgas tienen un intervalo entre 16-27 °C para su crecimiento en el que no sufren alteraciones, siendo un valor óptimo el de 24 °C. En lugares donde hay la presencia de temperaturas bajas pueden provocar una disminución en el crecimiento, así como temperaturas superiores a 35 °C provocarían que las microalgas colapsen.

- pH

Los cultivos de microalgas en su mayoría se encuentran en un rango de pH entre 7-9, siendo óptimo entre 8.2-8.7 (Ruiz Martínez, 2011). Un ascenso o un descenso en el pH puede causar una disminución en el crecimiento de las microalgas debido a un rompimiento en los procesos. La adición adecuada de dióxido de carbono o bicarbonato de sodio puede provocar la prolongación del crecimiento exponencial de la población de las microalgas. El dióxido de carbono y el bicarbonato de sodio pueden afectar el pH del cultivo por lo que debe ser revisado para mantenerlo en condiciones óptimas. Por ejemplo el CO₂ puede elevar el pH del cultivo a 11 matando las microalgas. Si el cultivo es sometido a periodos cíclicos de luz y oscuridad, se puede balancear el pH debido a que en los periodos de luz el pH aumenta, mientras que en los periodos de oscuridad se obtiene un descenso en el pH (Piñera, 2002).



CAPITULO 3

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Introducción

La Universidad de Cuenca a través del proyecto VLIR ha iniciado experimentaciones con microalgas con fines farmacéuticos en la Facultad de Ciencias Químicas mediante el Proyecto “Plantas Medicinales”. Sin embargo, el aprovechamiento de la biomasa algar con fines energéticos ha sido propuesto a través del proyecto “Caracterización biocinética y potencial energético de microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual” financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC) y el apoyo del proyecto VLIR. Parte fundamental de este proyecto ha sido la implementación de reactores que han sido desarrollados mediante técnicas de cultivo que se mencionan en la revisión de la literatura, con la finalidad de desarrollar métodos eficientes que mejoren las condiciones de crecimiento y adaptación de los cultivos de microalgas a escala laboratorio (Cabrera & Pulla, 2014).

3.2 Fotobioreactores

Existen muchos factores que influyen directamente el crecimiento de las microalgas como se anotó en el capítulo anterior. Por esta razón, para el cultivo previamente se necesita de ciertos requerimientos que deben ser controlados: un inóculo de las distintas familias de microalgas, la concentración de nutrientes, la temperatura, el pH, la cantidad de luz, y las concentraciones de O_2 y CO_2 .



Figura 3.1 Fotobioreactores implementados en el laboratorio, con los respectivos sensores de oxígeno y pH

En la figura 3.1 se ilustra los fotobioreactores instalados en el laboratorio sanitaria, de la facultad de ingeniería, en este caso se tiene cada reactor con la familia *Chlorella*, Familia *Scenedesmus*, Especie 1 y Especie 3, El fotobioreactor de la derecha fue empleado para las experimentaciones que se desarrollaron. Los observados en la izquierda, son utilizados como medios de cultivo.

3.3 Materiales para el Cultivo

- Inóculo: cantidad controlada de biomasa de cada familia de microalga aislada.
- Balanza de precisión 0.0001g “Excellence Analytical Balances” modelo XS-204 de METTLER TOLEDO. (ver *Figura 3.1*)
- Cápsulas de vidrio transparente. (ver *Figura 3.3*)
- Microscopio Inverted ECLIPSE *TSM 10 LED MV Nikon Corporation*. (ver *Figura 3.4*)



Figura 3.2 Balanza de precisión Excellence Analytica Balances

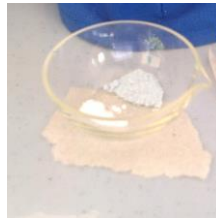


Figura 3.3 Cápsula de vidrio



Figura 3.4 Microscopio

3.3.1 Medio de Cultivo

Las algas requieren, nutrientes minerales para su crecimiento, sin embargo debido a que las algas no tienen los mismos requerimientos nutricionales, no todos los medios de cultivo son aptos para cultivar masivamente cualquier especie. Los medios de cultivo contienen principalmente nitrógeno, fósforo y potasio; además de la fuente de carbono inorgánico y otros minerales que en diferentes proporciones



suministran una fuente de alimento para las microalgas. Se sigue el mismo procedimiento de cultivo empleado en tesis anteriores a esta investigación (Cabrera & Pulla, 2014).

El medio de cultivo utilizado en esta investigación está conformado por:

- Fuente de Carbono: Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3) o Carbonato de Sodio (Na_2CO_3)
- Nutrientes: Abono Completo; constituido por: 12% de Nitrógeno, 12% de Fósforo, 17% de Potasio, 2% de Magnesio y otros micronutrientes
- Agua Destilada

3.3.2 Procedimientos para el Cultivo

Se siguió el procedimiento descrito en una tesis previa (Cabrera & Pulla, 2014) :

- Se utiliza una cantidad de biomasa concentrada en el 20% del volumen total del reactor
- El 80% de porcentaje restante del volumen del reactor se lo completa con agua destilada.
- Utilizando la balanza de precisión se suministra bicarbonato de sodio aproximadamente 0.07gramos por cada litro de reactor 0.1 gramos de nutrientes por cada litro de reactor.
- Alrededor del reactor se colocan lámparas fluorescentes programadas para encenderse y apagarse en períodos de una hora. (Ver en en la página 43 en 433.4.1)
- Se incorpora el sistema de agitación. (Ver en 3.4.1 más adelante 3.4.1 más adelante)
- Finalmente con la ayuda de un compresor se adiciona aire al reactor, mediante una manguera que a su vez se conecta a un aireador poroso.



3.4 Automatización del ensayo de respirometría en LabView

3.4.1 Componentes del Respirómetro

El respirómetro consta de tres partes imprescindibles.

- **Reactor:** Es el contenedor donde se llevan a cabo las reacciones biológicas. Para la presente investigación tenemos un respirómetro de características similares a un LFS de acuerdo a la clasificación de la IWA: L debido a que el oxígeno es medido en su fase acuosa, F por la producción continua de oxígeno por las microalgas y S la fase líquida está en condiciones estáticas. El fotobioreactor permite que aproximadamente un 90% de la luz atraviese las paredes transparentes, y de esta manera llegue a las células dentro del reactor, limitando así la contaminación con agentes externos como polvo, contaminantes o microorganismos (Richmond, 1988). El fotobioreactor está conformado por los siguientes elementos:
 - Reactor cilíndricos: Se empleó un reactor cilíndrico de acrílico transparente y liso de 15 cm de diámetro y 20 cm de altura, volumen total de 3.5 litros y volumen útil aproximadamente 3 litros. (Ver **Figura 3.6 (a)**)
 - Lámparas fluorescentes VOLTECH 250 V - 60Hz 250W, que rodean el reactor con control de encendido individual.
 - Sistema de agitación: Se utiliza un motor de agitación IKA RW 16 basic de 230V 50/60Hz, con una hélice IKA R 1342 de cuatro hojas de acero inoxidable, con regulación de velocidad entre 40-1200 revoluciones por minuto.
 - Soporte metálico para el sistema de agitación de motor IKA RW 16 basic de 230V 50/60Hz.
 - Compresor de aire electromagnético para acuarios ACQ-003, acoplado a una manguera de ¼” de diámetro, al final de esta un

aireador de material poroso, que además se debe encontrar dentro del reactor esto para la inyección de aire al cultivo cuando es necesario.

- Sensor de oxígeno disuelto , temperatura y presión InPro 6878i Mettler Toledo (Ver **Figura 3.6 (d)**)
- Sensor de pH YSI 4110. (Ver **Figura 3.6 (c)**)
- Sensor de pH Inpro 325X (ISM) (**Figura 3.6 (e)**)
- Luxómetro Sper Scientific 840020C Lux and Foot-Candles Light Meter. (Ver **Figura 3.6 (b)**)

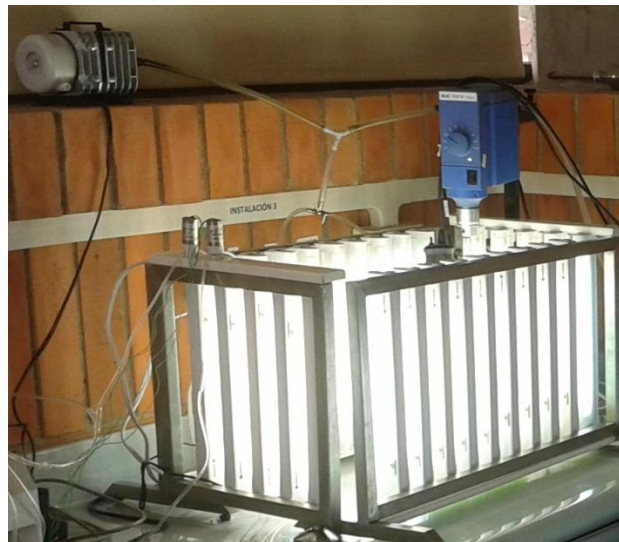


Figura 3.5 Reactor Ensamblado incluye: Compresor de aire, Sistema de Agitación, Lámparas fluorescentes.

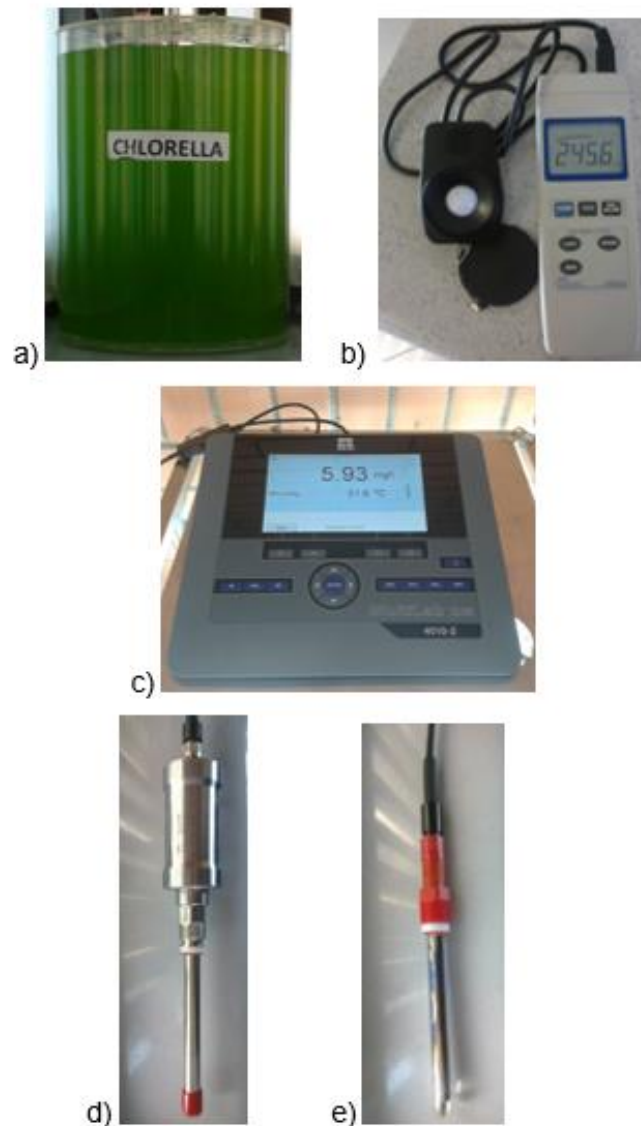


Figura 3.6 Materiales usados dentro de la configuración del respirómetro: a) reactor cilíndrico. b) Luxómetro. c) Sensor de pH YSI 4110. d) Sensor de oxígeno disuelto. e) Sensor de pH

- **Módulo de Acondicionamiento de señales:** Es el que actúa como transmisor, adapta las señales que se miden en el reactor para que puedan ser receptadas por el computador, es decir es el encargado de comunicar el reactor y el computador bidireccionalmente.

- Las señales emitidas por el sensor Inpro 6870i son acondicionadas a través de un transmisor M400 Mettler Toledo, que acondiciona las señales recibidas y finalmente las envía hacia la tarjeta de adquisición de datos.
- El Sensor de pH envía las señales recibidas directamente a través del módulo de lectura hacia la tarjeta de adquisición de datos.
- **Computador:** Es el cerebro del respirómetro haciendo que funcione de manera automática, se encuentra instalada la tarjeta de adquisición de datos NI USB-6341 (NI-DAQ) y mediante conexión USB conectada al computador en el cual se encuentra instalado el software LabView, formando un conjunto donde se pueda receptor, emitir, visualizar y almacenar los datos y operaciones requeridos para el proceso y control del respirómetro de manera bidireccional.

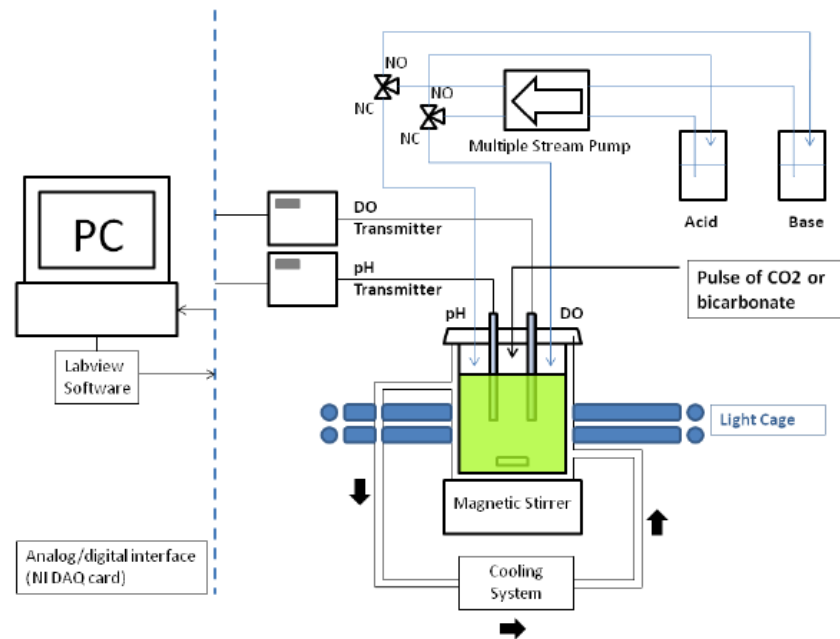


Figura 3.7 Esquema de un respirómetro automatizado (Janssens, 2010).

En la *Figura 3.7* se puede observar las partes del respirómetro a la derecha la bomba peristáltica, con sus respectivas soluciones de ácido y base, seguidos por el reactor, dentro de este los sensores de pH y Oxígeno Disuelto, con sus respectivos módulos de acondicionamiento de señales. Seguido se tiene la tarjeta de adquisición de datos y las lámparas fluorescentes rodeando el reactor.

3.4.2 Titulación

La unidad de titulación consiste en 2 botellas Erlenmeyer que contienen soluciones ácido y base de 0.5 M de ácido clorhídrico (HCl) y 0.5 M de hidróxido e sodio (NaOH) respectivamente. Una bomba peristáltica (Minipuls, Gilson) y cuatro válvulas selenoides (98302-02, Cole Parmer). La función de la bomba peristáltica es permitir la recirculación continua e inyección de las soluciones de ácido y base, como se puede ver en la *Figura 3.8*. La dosificación de estas soluciones se realiza por medio del cambio de la posición de las válvulas normalmente abierta (NO) y normalmente cerrada (NC), la posición o estado de las válvulas es controlado por un relé, y este a través de un algoritmo que responde al cambio del rango de 7.5-8 establecido como un valor óptimo de pH para el cultivo de microalgas. Si el pH en el reactor supera el rango establecido, se dosifica una cierta cantidad de ácido; cuando el pH disminuye por debajo del rango establecido se adiciona una cantidad de base en el reactor.

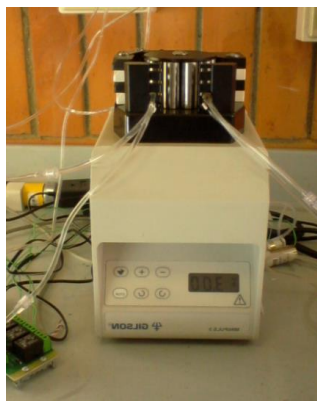


Figura 3.8 Bomba Peristáltica Minipuls 3 GILSON



3.4.3 Descripción de Hardware

En la siguiente tabla se presenta un resumen de todos los componentes que constituyen la configuración del hardware.

Componente	Tipo-Marca	Descripción
Sensores		
Electrodo de OD	InPro 6878i -Mettler Toledo	Sensor de oxígeno disuelto, temperatura y presión
Cable para electrodo de Oxígeno disuelto	3m de longitud Mettler Toledo	Cable para la transmisión de datos
Electrodo de pH	Sensor IDS-pH: YSI 4110	Sensor de datos de pH, ØxL: 12x120 mm
Cable para electrodo de pH	3m de longitud Mettler Toledo	Cable para la transmisión de datos de pH
Transmisores		
Transmisores de Oxígeno	Mettler Toledo	Transmisor de señales de oxígeno, temperatura.
Transmisor de pH	Multilab 4010-2	Transmisor de señales de pH
Adquisición de datos		
Tarjeta de adquisición de datos DAQ	NI USB-6341 - National Instruments	Comunicación entre el hardware
Mangueras		
Manguera para bomba Gilson	NI USB-6341 - National Instruments	Tubo necesario para bomba Gilson
Manguera para válvulas selenoides	Coler Parmes 1/8"	Mangueras de polietileno de alta densidad que conectan las válvulas con el ácido o base
Mangueras para reciclaje del caudal		Mangueras delgadas de plástico transparente
Hardware – Varios		
Fotobiorreactor	3000ml y 3500ml	Reactores cilíndricos acrílico y de vidrio transparente ØxL: 15x120 cm.



Bomba Gilson	Minipuls 3	Bomba peristáltica, para transferencia de fluidos.
Botella de Acido	-	Erlenmeyer
Botella de Base	-	Erlenmeyer
Válvula Solenoide de estrangulación	98302-02 - Cole Parmer	Válvulas NO (normalmente abiertas) y NC (normalmente cerradas) de 15 psi
Rele	RAYEX-ELEC	Dispositivo utilizado para abrir o cerrar un circuito

Tabla 3-1 Resumen de los componentes de la configuración del hardware

3.4.4 Descripción de Software

Para la adquisición de datos, el control, y la operación del respirómetro se automatizó el proceso con el software LabView “*Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench*” (National Instruments). LabView es un lenguaje de programación gráfica que usa íconos en lugar de códigos de texto, se llama lenguaje G y sirve para crear programas basados en diagramas de bloque. Labview trabaja con una estructura jerárquica, la cual es basada en Instrumentos Virtuales (VI). Un VI tiene dos interfaces: Una interfaz gráfica “*front panel*” y un diagrama de bloques o código “*block diagram*”.

La interfaz gráfica o *front panel*: Es la interfaz del usuario en VI del software, es donde un determinado usuario puede controlar o ver un determinado proceso, aquí entran o salen datos proporcionados por el programa. En la presente investigación se creó la siguiente interfaz gráfica.

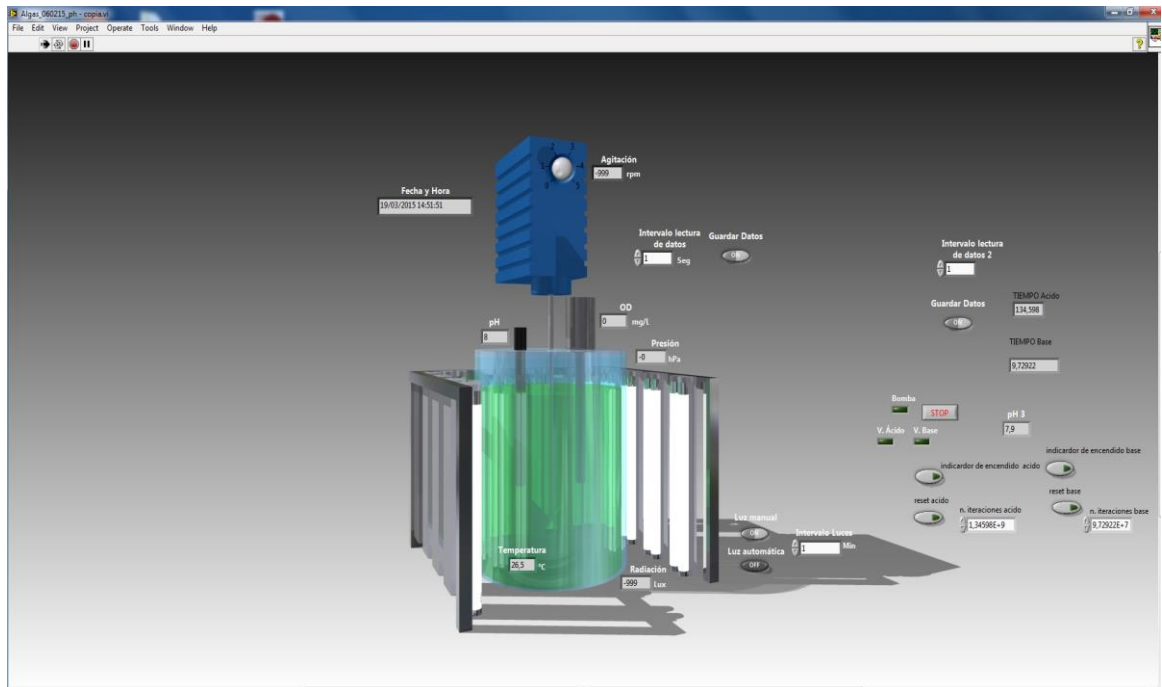


Figura 3.9 Interfaz gráfica del ensayo de respirometría

El diagrama de bloques o *block diagram*: Es la interfaz del programa donde se escribe el código. Es decir donde se configura y construye el programa, a través de una DAQ: El diagrama de bloques incluye todas las funciones, estructuras, etc. que son necesarias para la programación en LabView. Todas las funciones programadas para el respirómetro se encuentra dentro de un VI, y este de forma jerárquica se encuentra dividido en secciones:

Adquisición de datos de oxígeno disuelto, presión y temperatura: A través de NI-DAQ, Dentro de un diagrama de bloque en la función *DAQ Assistant* para configurar las señales recibidas por el transmisor que luego deberán ser visualizadas en el panel frontal. La secuencia consta de una estructura *while loop* que consiste en una estructura repetitiva, con cierto procedimiento dentro de ella, en este caso se encuentra dentro de esta estructura la adquisición de datos y el control del pH, que son visualizados a través de la pantalla del computador.

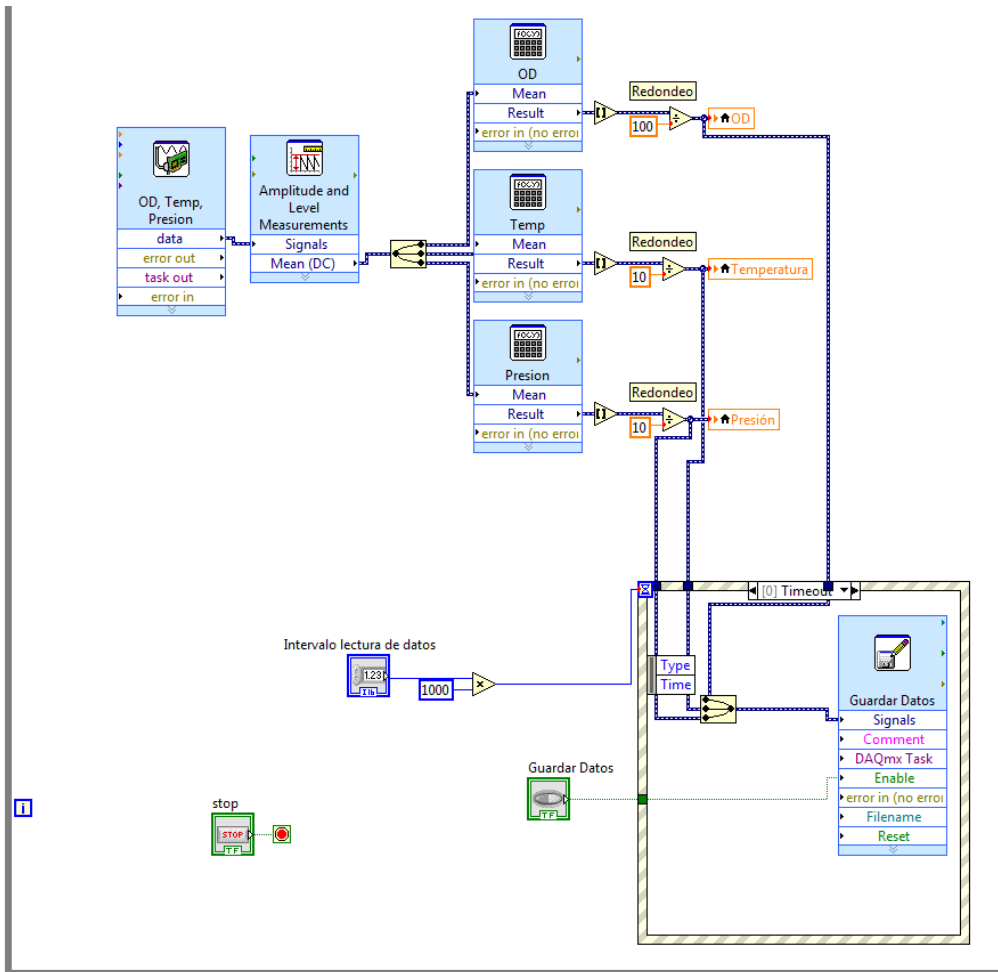


Figura 3.10 Adquisición de datos de oxígeno disuelto, temperatura y presión.

Automatización de la irradiación de luz (Ver Figura 3.11): Se puede configurar manualmente o de manera automática, esta última se le puede configurar de acuerdo a intervalos de tiempo en la que el usuario debe ingresar a través de una secuencia lógica de LabView “*event structure*”. Esto depende de la necesidad de luz para los correspondientes experimentos. Además el proceso dentro de LabView es controlado por un “*while loop*”.

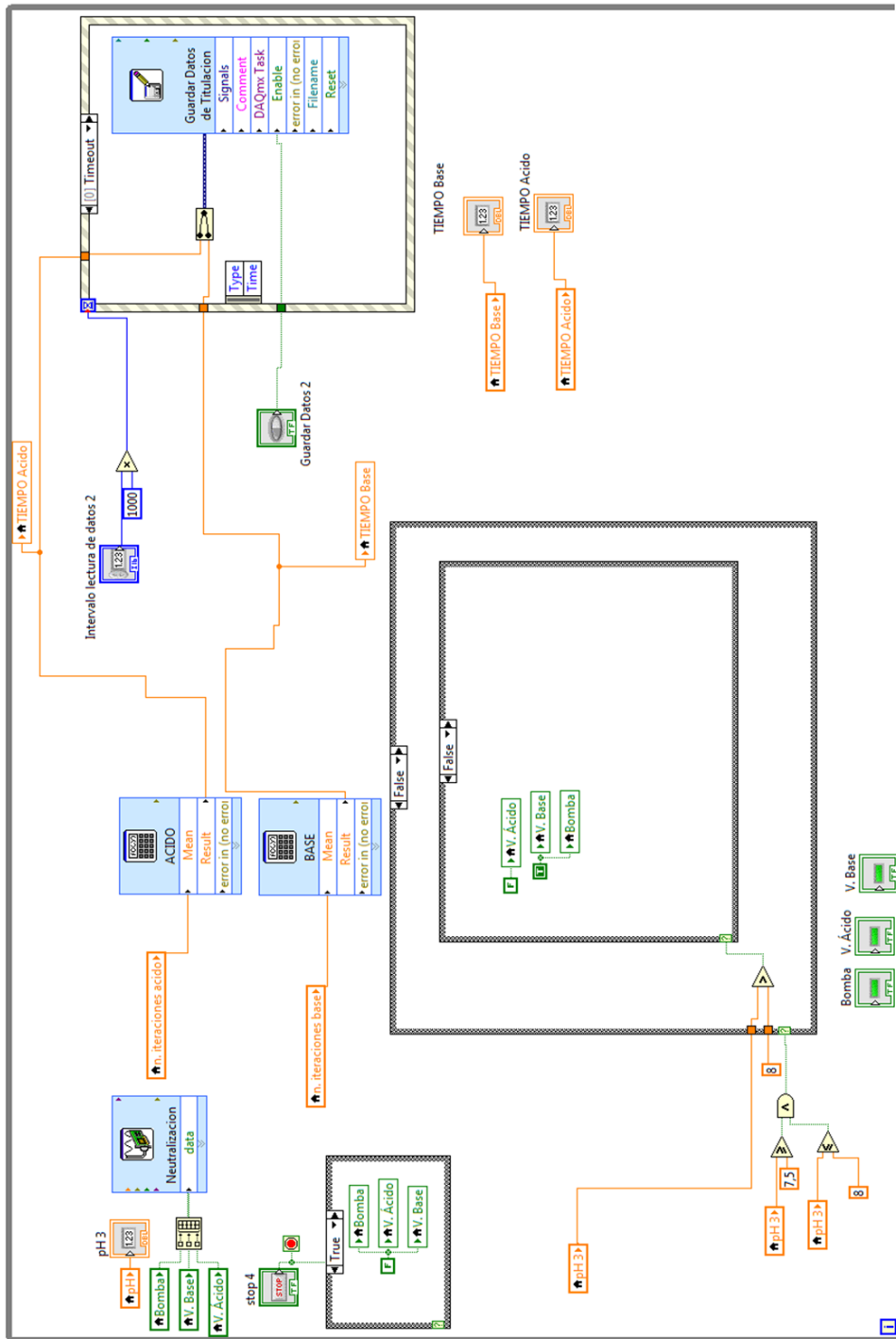


Figura 3.12 Automatización de la dosificación de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.

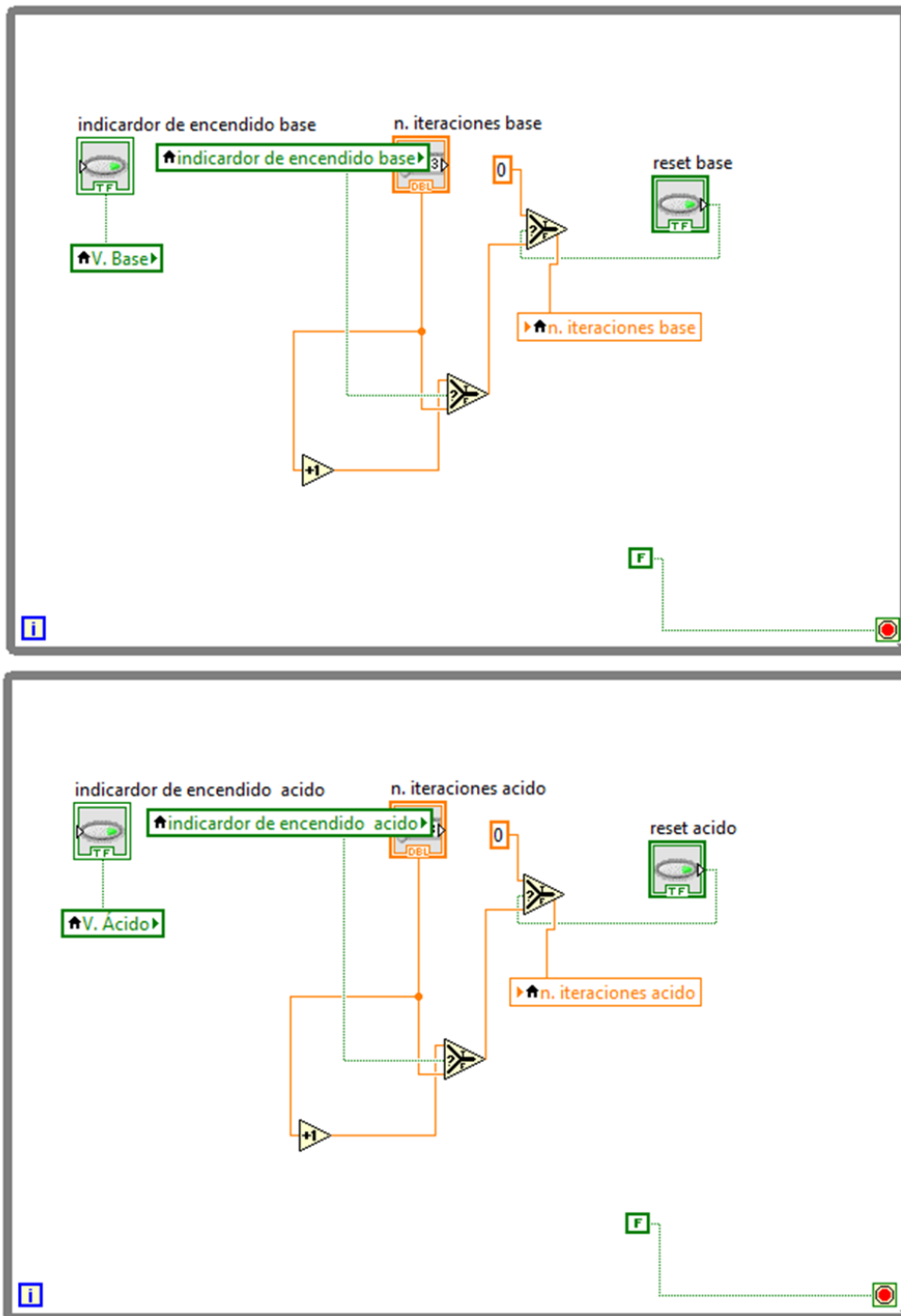


Figura 3.13 Contador de la cantidad de ácido y base

En la **Figura 3.13**, se muestra la programación de un contador, con la finalidad de determinar la cantidad de ácido o base dosificada en un tiempo dado hacia el reactor. La cantidad de ácido o base fue previamente calibrada con el peso de las soluciones de un número controlado de goteos, mediante la balanza de precisión (*Exellence Analytica Balances*). Se asume la densidad de las soluciones igual a la del agua, por lo que se obtiene directamente el volumen adicionado al reactor que es la cantidad de ácido o base necesaria para mantener en equilibrio el pH dentro del reactor.

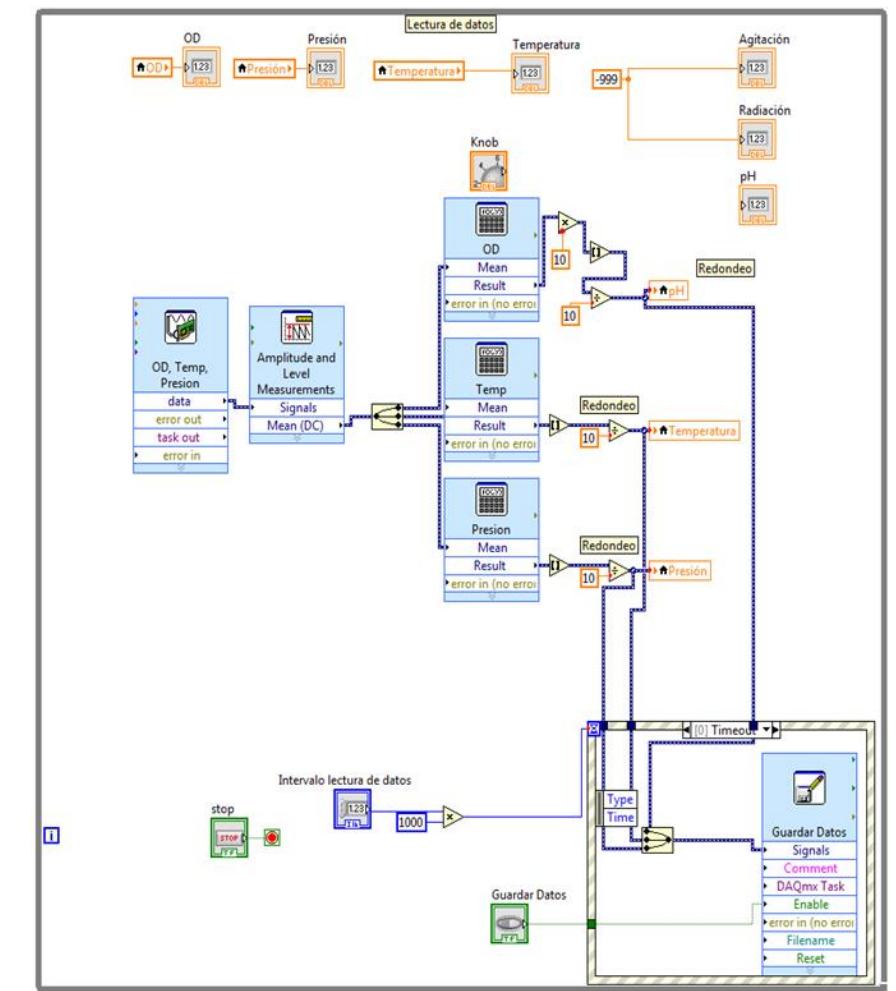


Figura 3.14 Automatización de la adquisición de datos



3.5 Métodos empleados para la determinación de constantes cinéticas de las microalgas

3.5.1 Producción de Oxígeno y tasa de transferencia de Oxígeno

La velocidad de producción de oxígeno de las algas y la velocidad a la que el oxígeno deja el sistema por difusión a la atmósfera pueden calcularse a partir de la medida y corrección de las concentraciones de DO. La pendiente de la curva de DO es el resultado del equilibrio entre la tasa de producción de oxígeno (OPR) por parte de las microalgas y la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) desde la solución acuosa hacia la atmósfera. La ecuación 3.1 muestra la relación matemática que expresa la dinámica del oxígeno en el reactor.

$$\frac{dS_o}{dt} = OPR + OTR \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde:

S_o = La concentración de oxígeno disuelto

t=tiempo

OPR= Tasa de producción de oxígeno

OTR= Tasa de transferencia de oxígeno

El valor de OTR puede ser determinada mediante la ecuación Ec. 3.2

$$OTR = K_L a (OD_o - OD^{sat}) \quad \text{Ec. 3.2}$$

Donde:

$K_L a$ =Coeficiente de transferencia de oxígeno (d^{-1})

OD_o = Concentración de oxígeno disuelto.

OD^{sat} = Concentración de oxígeno disuelto saturado.



El valor de K_{La} se obtiene de la pendiente de la curva de DO a partir del punto cuando el recurso de carbono es consumido completamente. En este punto, en la ecuación Ec. 3.1 el término OPR es igual a 0. En la ecuación Ec 3.2, OD_0 es el valor de oxígeno disuelto obtenido de los datos de respirometría a través del sensor de oxígeno disuelto y OD^{sat} es el valor de la concentración de oxígeno saturado, que para las condiciones atmosféricas del laboratorio se establece en 6.95 para una temperatura de 17 °C. Obteniendo el valor de K_{La} se puede graficar la curva OTR con respecto al tiempo.

3.5.1.1 Constante de tiempo de Oxígeno Disuelto

Cada sensor tiene una respuesta dinámica transitoria, que se llama inercia de un sensor. La dinámica de los sensores de la concentración de oxígeno disuelto ha sido descrita como un proceso de primer orden, con una constante de tiempo entre 5 y 100 segundos (Janssens, 2010). Siendo esta la medida de tasa de respuesta del sensor, que reacciona a un cambio real en la variable medida.

La constante de tiempo de un sensor se obtiene por inmersión del sensor en agua saturada (6.95 mg OD/l), este valor de acuerdo a la tabla de valores de Saturación de Oxígeno en función de la Altura y la Temperatura (Peñañiel, 2014), a una solución de sulfito, en donde la concentración de oxígeno disuelto es muy cercana a cero. Se toma el valor de OD cada 5 segundos para obtener una curva mientras descende el valor. Se repite el procedimiento pero de manera inversa, es decir se sumerge el sensor de OD nuevamente agua saturada. Se realiza varias repeticiones de este procedimiento y se obtiene los valores promedio. Para la realización de los cálculos siguientes se emplea la ecuación 3.2.

$$S(t) = A * e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)} \quad \text{Ec. 3.3}$$

Donde:

A es igual a la concentración de oxígeno saturado,

t es el tiempo de los datos tomados y



τ es la constante de tiempo de cada sensor que debe ser determinada de la ecuación 3.3.

Se grafica $(S(t))$ con respecto al tiempo, y se determina la pendiente del gráfico, siendo esta τ la constante de tiempo del electrodo de Oxígeno Disuelto.

3.5.1.2 Corrección de datos de OD

Una vez obtenida la constante de tiempo, se debe corregir los datos obtenidos en los experimentos respirométricos, esto debido a que el valor de OD indicado por el sensor se retrasa ligeramente con el valor real que ocurre dentro de reactor. Para el efecto se utiliza la ecuación 3.4. (Vanrolleghem & Spanjers, 1998):

$$OD_{corr} = \tau * \frac{dOD,medido}{dt} + OD,corr \quad \text{Ec. 3.4}$$

3.5.2 Sistema de Carbono

Si el pH se encuentra en valores menores a 6.36 ($pK_{a1}=6.36$) la especie predominante de carbono es el dióxido de carbono, cuando existen valores mayores a 10.33 ($pK_{a2}=10.33$) la especie predominante de carbono es el carbonato, mientras si existen valores dentro del rango 6.36 - 10.33, la especie de carbono presente es el bicarbonato (N. Janssens, 2009).

(Wolf, Piciooreanu, & van Loosdrecht, 2007) Quienes modelaron el procesos de algas dentro de un biofilm. Introdujeron el dióxido de carbono y el bicarbonato como fuente de carbono y energía, para el crecimiento de las microalgas.

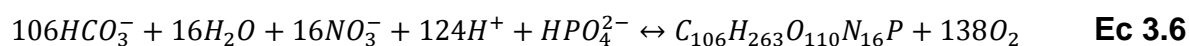
3.5.3 Respiración y Producción

Las microalgas convierten el carbono inorgánico y el agua en oxígeno y materia orgánica, a través de la fotosíntesis. Se proponen 2 posibles ecuaciones



estequiométricas de fotosíntesis y respiración de microalgas (Morgan & Lahav, 2007).

De estas ecuaciones se deduce que el pH del agua asciende, debido a la alcalinidad, la cual es definida como la suma de la cantidad de bicarbonato, carbonato e hidróxidos menos la cantidad de protones.



En lagunas de estabilización el 80% del oxígeno presente es producido por los procesos de fotosíntesis, En las lagunas facultativas el oxígeno producido puede llegar a ser 1.7 g de O₂ m⁻²h⁻¹ y en la laguna de maduración 1.2 g de O₂ m⁻²h⁻¹. El carbono consiste en el 40-45% del peso seco de las algas (DW) (Shilton, 2005).

3.5.4 Protocolo de respirometría

Se toma una muestra de algas y se centrifuga a 4000 rpm por 4 minutos en la centrifuga “*Thermo Scientific Heraes Megafuge 8*” (**Figura 3.15**). Esto sirve para separar las algas del medio en el que se encuentran, y ponerlas en una solución donde se conozca su exacta composición y concentración.



Figura 3.15 Centrifuga “Heraeus Megafuge 8”

Los electrodos de ácido y base deben estar calibrados y verificar su funcionamiento correcto, la biomasa algar se diluye en 3000ml de agua destilada. Luego se obtiene la concentración exacta de las microalgas como se describe en el apartado 3.5.5 Se toma el valor de la turbiedad antes y después del experimento.

El programa creado en LabView inicia y empieza el registro de datos. Antes del pulso de bicarbonato se debe estabilizar las señales de pH y OD. Es decir el oxígeno producido por el consumo de CO₂ disuelto que está presente en el sistema debe estar en equilibrio con la cantidad de oxígeno emanado a la atmósfera, no deben existir grandes variaciones en los valores de OD. El bicarbonato que será añadido a cada experimento, debe estar disuelto en agua destilada, el cual también debe estar dentro del pH óptimo, de tal manera que la sustancia añadida no genere alteraciones de pH en el reactor.

3.5.5 Determinación de la concentración de algas

Para la determinación de la concentración de algas en una solución se sigue el siguiente procedimiento: Se seca por lo menos una hora en el horno a 109 °C un filtro Whatman (φ 110mm) “*glass microfiber filter*” (Ver **Figura 3.16 a**) Bomba de

vacío b) Embudo de porcelana c) Filtros Whatman (φ 110mm) **Figura 3.16**), evitando manipularlo para no contaminarlo. Luego el filtro es pesado en la balanza, obteniéndose la masa m_1 en gramos. El siguiente paso es obtener una muestra homogenizada de volumen de suspensión de algas (V). Luego se filtra la muestra con la ayuda de una bomba de succión (Ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). La muestra filtrada se deja secar durante cuatro horas en el horno a una temperatura de $109\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se obtiene la masa m_2 en gramos. De las dos masas y el volumen de la suspensión se obtiene la concentración de las algas usando la ecuación 3.6. El procedimiento descrito se realiza por 3 ocasiones y se obtiene el promedio.

$$X = \frac{(m_2 - m_1) * 1000}{V} \quad \text{Ec 3.6}$$

Donde:

X = concentración de la biomasa algar [mg/l]

m_1 = masa del filtro [g]

m_2 = masa del filtro más biomasa [g]

V = volumen de algas a ser filtrado [l].



Figura 3.16 a) Bomba de vacío b) Embudo de porcelana c) Filtros Whatman (φ 110mm)

3.5.5.1 Turbiedad

Otra forma de obtener una medida cualitativa de la concentración de la biomasa algar, es a través de la turbiedad de la suspensión. Para esto se utiliza un turbidímetro Turb 555 (Ver **Figura 3.17**). En este procedimiento no se consume biomasa y la medida determinada es instantánea. De igual manera se toman medidas al inicio y al final del experimento. Este método permite establecer una correlación entre las dos medidas de concentración y estimar un valor aproximado de peso seco de algas (DW) a través de la turbiedad.



Figura 3.17 Turbidímetro Turb 555

3.5.6 Tasa de adición de Protones



Debido a que el bicarbonato es añadido al sistema consume protones presentes en el sistema de las microalgas, con la ecuación 3.6 se obtiene el valor de protones que son consumidos por un gramo de bicarbonato.

Se tiene que 1 gramos de bicarbonato corresponde a 19.18×10^{-3} gramos de protones. Para obtener la tasa de adición de protones, (HAR) para el consumo de bicarbonato, se debe determinar a través de la pendiente de titulación inicial llamada PTAR, menos la pendiente BSAR (tasa de adición de protones de fondo) que corresponde a la segunda pendiente, una pendiente de menor valor debido a que el consumo de protones es mucho menor que en la parte inicial.

El HAR puede ser, se puede expresado por peso seco, y se tendría P_H , para cada experimento.

Debido a que se utilizó Ácido Clorhídrico 0.5M, se emplea la siguiente fórmula para obtener la concentración de protones en el reactor.

$$\text{Concentración de ácido} = \frac{(v * 0.5 * \text{Equivalente Químico})}{1000 * Vol}$$

Donde:

v= volumen de ácido dosificado [cm³]

Equivalente químico: para el HCl=36.45 [g]

Vol= volumen del reactor [l]

Con esta ecuación de obtiene la concentración de ácido, este ácido se separa en protones, y a través de la estequiometria se tiene que 36.45 gramos de ácido produce 1 gramos de protones.



CAPITULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Introducción

Para la obtención de los resultados respirométricos, se realizaron varias pruebas de manera automatizada variando todas las condiciones externas como son las diferentes cantidades de bicarbonato, distintas radiaciones de luz y concentraciones de biomasa. El procesamiento de los resultados obtenidos permite obtener las constantes cinéticas para luego establecer una comparación entre las especies estudiadas.

4.2 Resultados Respirométricos

El presente trabajo de investigación se enfocó en obtener la respuesta cinética de tres familias de microalgas: Chlorella, Scenedesmus y Especie 1. Inicialmente se presenta los resultados de las operaciones preliminares rutinarias para asegurar la calidad de la información recolectada en los experimentos.

4.2.1 Determinación de la Constante de Tiempo del Electrodo de Oxígeno Disuelto.

Los resultados de varias repeticiones del procedimiento explicado en la sección 3.5.1.1, se muestran en la Tabla 4-1.

	Constante de Saturación A		constante de tiempo (τ) (min^{-1})	
	creciente	decreciente	creciente	decreciente
Experimentos	5.06	7.25	0.99	0.85
	6.38	7.32	0.83	0.65
	6.31	7.21	0.96	0.63



	7.15	7.23	0.93	0.93
Promedio	6.74		0.85	
Desviación Estándar	0.79		0.14	

Tabla 4-1 Valores calculados de la constante de tiempo del electrodo de Oxígeno Disuelto

Se determina que la constante de tiempo está dentro del rango de respuesta de los electrodos (5-100 segundos). Janssens (2009) recomienda cambiar el electrodo si este requisito no se cumple, ya que ocasionaría datos erróneos en la obtención de datos. Se realizaron varios experimentos tanto de forma ascendente como descendente, es decir de la solución de sulfito a una solución de agua y viceversa, para de esta forma obtener un promedio de la constante de tiempo, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4-1. La figura 4.1 muestra el resultado de un experimento, para obtener la constante de tiempo, para el electrodo de oxígeno disuelto.

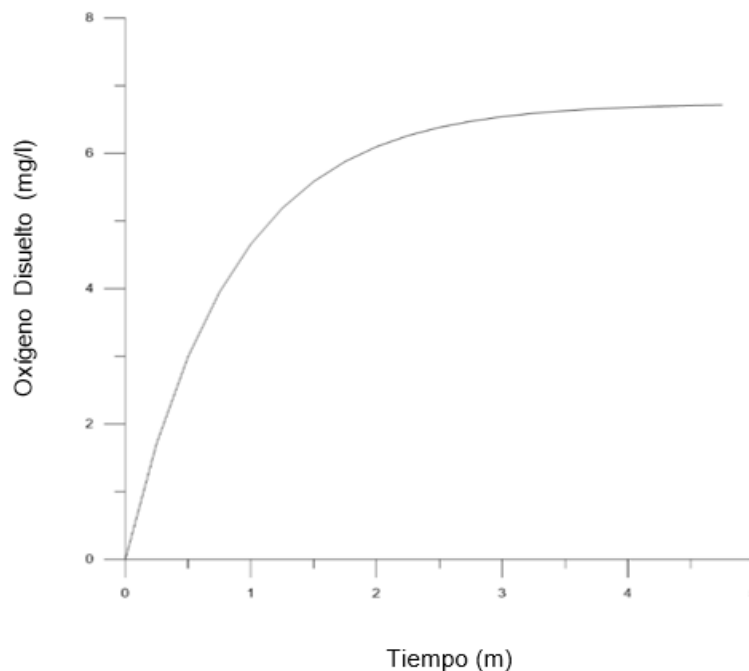


Figura 4.1 Curva obtenida en un experimento para determinar la constante de tiempo del electrodo de OD



4.2.2 Obtención de Parámetros cinéticos de la familia Chlorella

El resultado del ensayo de Respirometría aplicado a la familia Chlorella, fue obtenido luego de la adición de 1,005 g de bicarbonato (NaHCO_3) disueltos en 50 ml de agua destilada, esta mezcla se estabilizó con un pH de 7.5 para evitar cambios bruscos en el pH del reactor. Al inicio del experimento el reactor tiene una cantidad de luz de 2187 Lux, medida con el luxómetro. El procedimiento sigue con la toma de una muestra puntual del reactor para obtener el valor de la turbiedad de 16.06 NTU. La concentración de microalgas evaluada fue de 58 mg DW/l. La biomasa algar extraída del cultivo debió ser sometida a centrifugación para conseguir separar las algas del medio de cultivo en el que se encuentra. Al final del experimento la turbiedad evaluada fue de 22.26 NTU.

En la figura 4.2 se puede observar el incremento de la concentración de oxígeno disuelto después de la adición del pulso de bicarbonato. En este periodo se produce mayor cantidad de oxígeno por las microalgas que la que está siendo removida del sistema a la atmósfera, luego de este aumento brusco se encuentra nuevamente una fase de equilibrio, aproximadamente entre 0.4-0.8 días. Finalmente, se agota el recurso de carbono que fue añadido al sistema, y se altera la fase de equilibrio, iniciando el descenso de la concentración de oxígeno disuelto. Este experimento llevó a cabo con 1.005 g de NaHCO_3 equivalente a 0.73 gramos de bicarbonato agregados en 3100 ml de solución de algas.

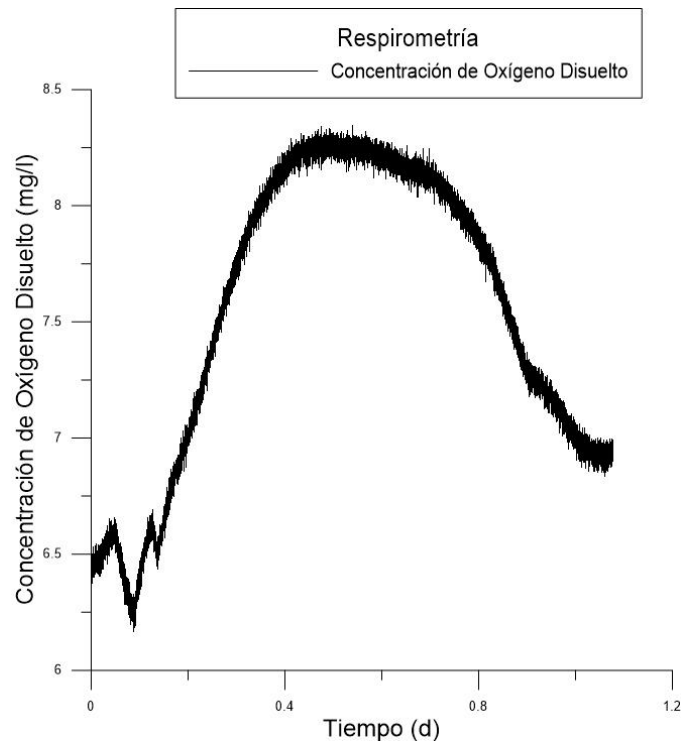


Figura 4.2 Resultado de un ensayo de respirometría con la familia Chlorella

4.2.2.1 Determinación de la Tasa de Producción de Oxígeno.

De lo expresado en el apartado 3.5.13.5.1 más atrás para determinar el OTR, se evalúa primero la concentración de saturación de oxígeno disuelto determinado para las condiciones del laboratorio en 6.95 mg.l^{-1} . Para la obtención de la tasa de producción de oxígeno y la tasa de transferencia de oxígeno se llevó a cabo el proceso descrito en la sección 4.3. La cantidad de luz utilizada fue de 1810 Lux. Una vez preparado el reactor se toma una muestra puntual para determinar la turbiedad igual a 50.59 NTU y una concentración de algas de $51,67 \text{ mg DW.l}^{-1}$. Al final del experimento se tiene una turbiedad de 41.70 NTU.

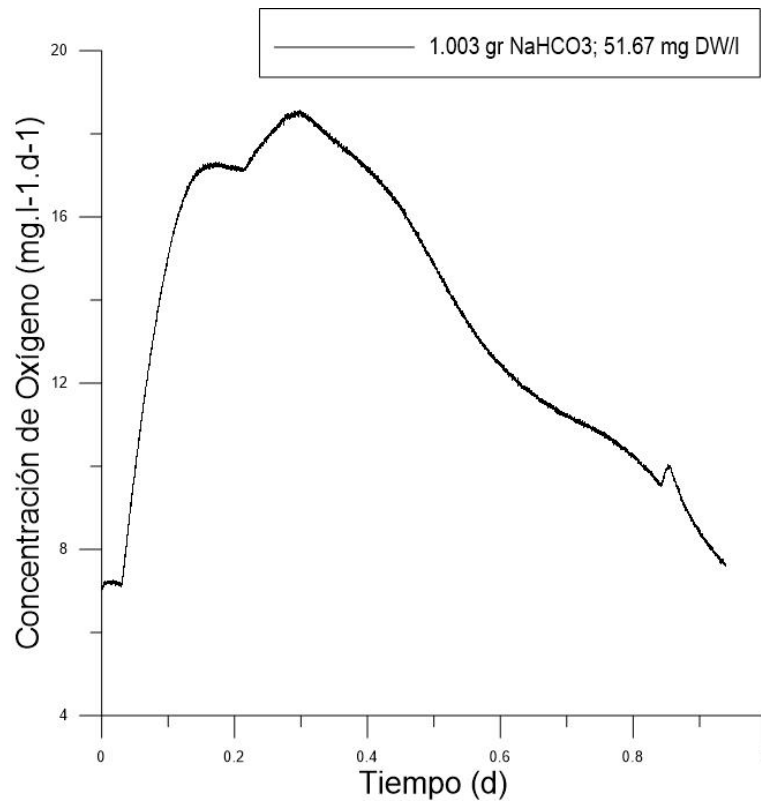


Figura 4.3 Resultado de la Curva respirométrica 1.003gr de NaHCO₃; 51.67 mg DW.l⁻¹

Una vez obtenido el perfil de la concentración de oxígeno disuelto, se procede al cálculo de los valores de OPR y OTR, para este último se requiere el valor de K_{La} , siendo este igual a 13.09 d⁻¹. El máximo valor de OPR calculado es igual a 152.18 mg.l⁻¹.d⁻¹. La máxima tasa de producción de oxígeno por peso seco de algas (DW) por unidad de tiempo es igual a 2.95 mg O₂.mg⁻¹DW.d⁻¹.

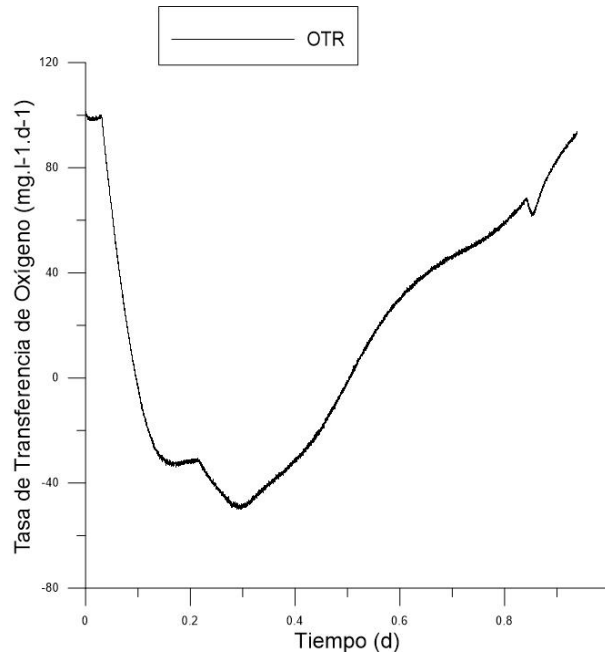


Figura 4.4 OTR del experimento mostrado en la **Figura 4.3**

La cantidad total de producción de oxígeno fue calculada al obtenerse el área bajo la curva de la tasa de producción de oxígeno OPR en función del tiempo, dando como resultado el valor de la tasa total de oxígeno producida igual a 82.52 mg, este valor es bastante bajo si se compara con la producción de oxígeno teórica, obtenida a partir de la estequiometria, (Ver 3.5.3), es decir que:

$$\frac{138O_2}{106HCO_3^-} = \frac{138 \cdot \frac{32g}{mol}}{106 \cdot \frac{61g}{mol}} = 0.683g O_2/g HCO_3^- \quad \text{Ec 4.1}$$

Se concluye, que cada gramo de bicarbonato produce 0.68 g de oxígeno. Al sistema se añadió la cantidad de 728.6 mg de HCO₃, por lo tanto se obtiene la cantidad teórica de oxígeno producida, es 497.65 mg de oxígeno que debería ser producido, pero solo un 16.6% de oxígeno fue recuperado.

OPR max (mg.l ⁻¹ .d ⁻¹)	P _{O₂,max} (mgO ₂ .mg ⁻¹ DW.d ⁻¹)	Oxígeno Producido (mgO ₂ .l ⁻¹)	K _L a (d ⁻¹)
152,18	2,95	82,52	13,09



Tabla 4-2 Resumen de los datos Calculados de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** de respirometría

4.2.2.2 Titulación

Con la adición de bicarbonato a los experimentos, se evidenció que se eliminan protones del sistema, dando como resultado que el pH de la solución algar ascienda. Durante la titulación se mantuvo el pH con la adición de ácido entre 7.5 y 8, a través de la automatización del procedimiento de titulación. Se puede observar una línea ascendente que representa la adición de ácido al sistema mientras se consume el recurso de carbono, en este caso el bicarbonato, lo que significa que la eliminación de protones es constante durante el consumo de carbono, en resumen el bicarbonato produce oxígeno pero elimina protones, por lo que se debe adicionar acido mostrado en la Figura 4.5.

La pendiente antes del consumo de bicarbonato representa la tasa total de adición de protones representada por (TPAR) que es igual al valor de $7.39 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$. En la **Figura 4.5** Resultado de Respirometría y Titulación de un Experimento aplicado en la familia Chlorella **Figura 4.5** se puede observar que sigue una pendiente mucho menor, a partir de 0.2d aproximadamente, es decir, luego del consumo del recurso de carbono, a esta pendiente se le denomina BSAR y es igual $0.37 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Luego se tiene que de la resta de la tasa total de adición de protones menos la tasa de adición de protones de fondo representa el (HAR) que es la tasa de adición de protones, igual $7.02 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Este último valor HAR se puede expresar por peso seco de algas (DW), determinado al inicio del experimento. Para este experimento tiene un valor de $222.56 \text{ mg DW.l}^{-1}$, siendo denominado P_H siendo igual a $0.03 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

La cantidad total de protones añadidos al sistema se obtuvo integrando el perfil de la titulación, luego de proceder a calcular, el valor es igual a $0.42 \text{ mg H}^+.\text{l}^{-1}$.

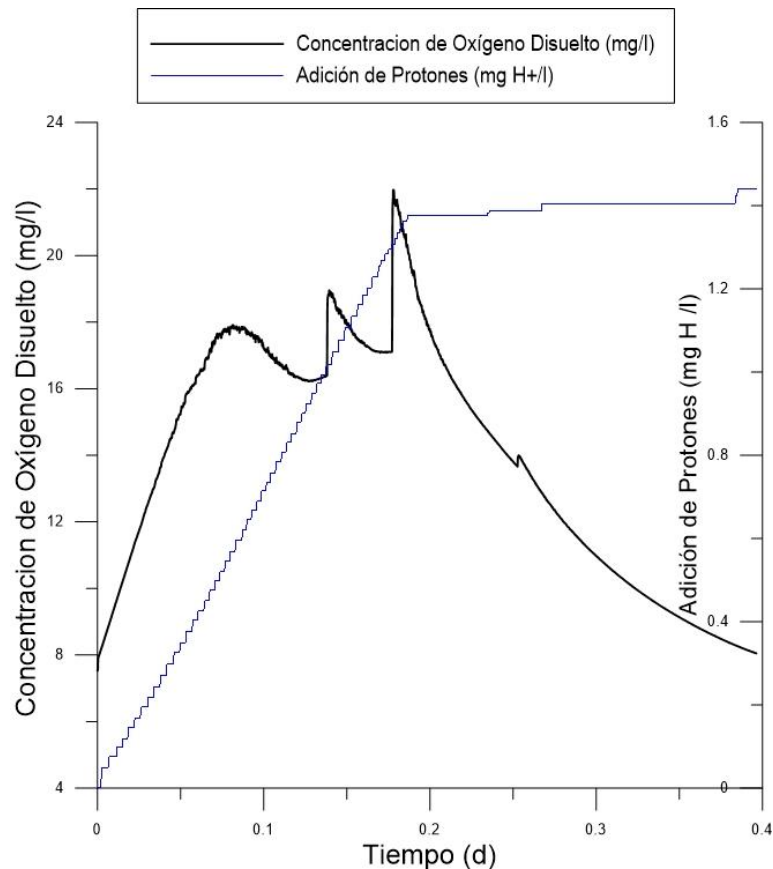


Figura 4.5 Resultado de Respirometría y Titulación de un Experimento aplicado en la familia Chlorella

4.2.3 Resultados de la familia Scenedesmus

El resultado del ensayo de Respirometría aplicado a la familia Scenedesmus, fue obtenido luego de la adición 1,0064 g de bicarbonato (NaHCO_3) disueltos en 50ml de agua destilada, esta mezcla se estabilizó con un pH de 7.5 para evitar cambios bruscos en el pH del reactor. Al inicio del experimento el reactor tiene una cantidad de luz de 1723 Lux, medida con el luxómetro. El procedimiento sigue con la toma de una muestra puntual del reactor para obtener el valor de la turbiedad siendo de 23.51 NTU, y otra muestra a fin de permitirnos saber la concentración de algas. La concentración de microalgas se lo realizó como lo descrito en la sección de

materiales y métodos, después de realizar el procedimiento descrito se obtuvo un resultado de 88 mg DW/l.

La biomasa algal extraída del cultivo debió ser sometida a centrifugación para conseguir separar del medio de cultivo, en el que se encuentra. Al final del experimento se tomó otra muestra puntual para tener el valor de la turbiedad al siendo igual a 47.09 NTU. El perfil de la concentración de oxígeno disuelto, mostrado en la Figura 4.6 indica que al inicio del pulso de bicarbonato, el perfil de la concentración de oxígeno disuelto presenta un ascenso hasta 0.15 días aproximadamente. El presente resultado tiene similitud con el perfil de la microalga *Chlorella*, con la diferencia de que el oxígeno producido es mayor e igual a 22 mg/l aproximadamente. Al experimento se agregó 1.0064 gramos de HCO_3^- , correspondientes a 0.73 gramos de bicarbonato.

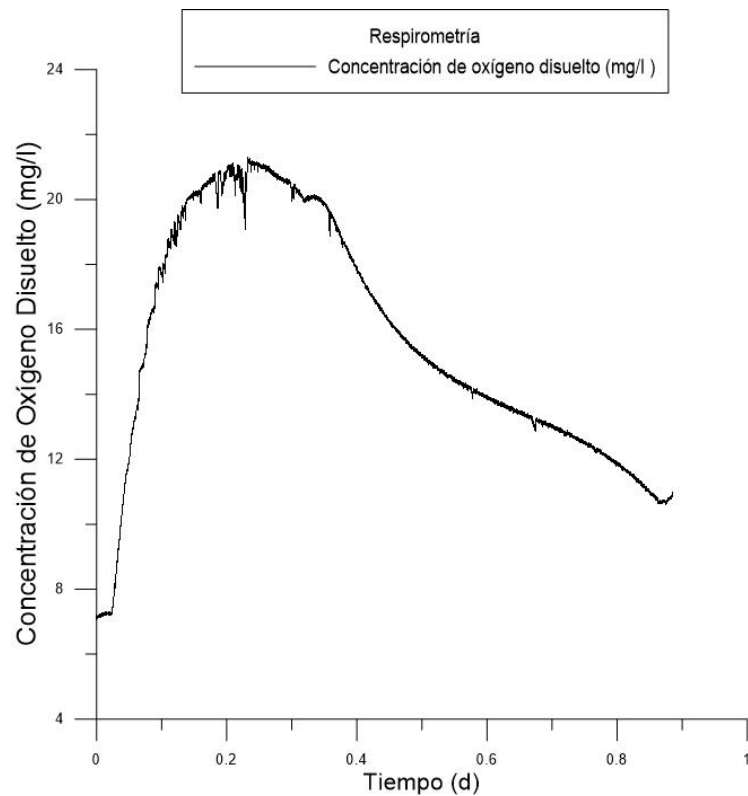


Figura 4.6 Resultado del ensayo de Respirometría aplicado a la familia Scenedesmus

4.2.3.1 Determinación de la Tasa de Producción de Oxígeno.

A continuación en la Figura 4.7 se presenta el perfil de oxígeno disuelto de un experimento aplicado a la familia Scenedesmus. En el experimento se agregó un pulso de bicarbonato de sodio de 1.002 gramos disueltos en 50 ml de agua destilada, esta mezcla se estabilizó con un pH de 7.5 y una cantidad de luz de 1630 Lux.

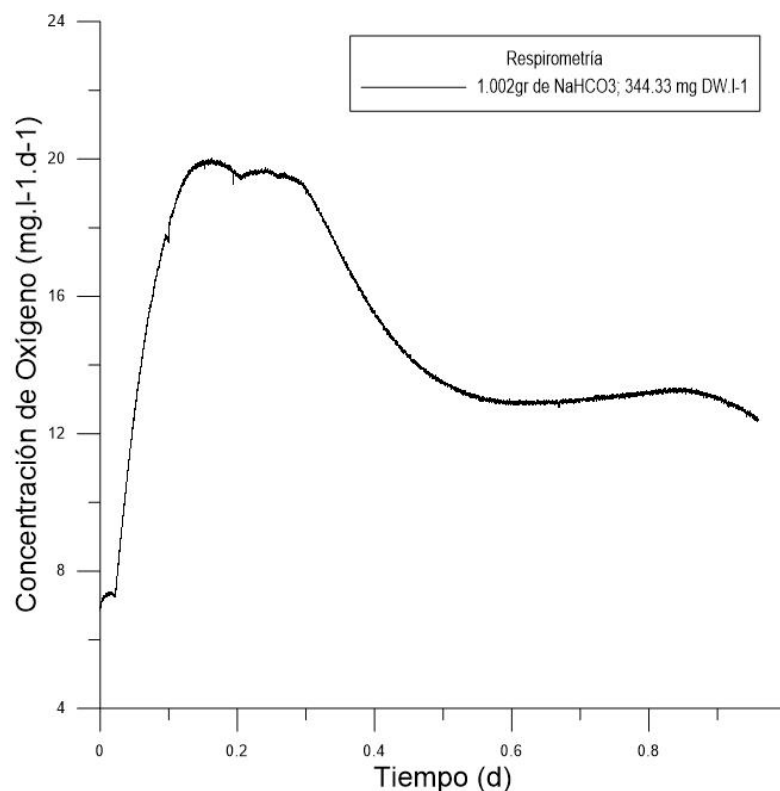


Figura 4.7 Resultado de Curva respirométrica de microalga Scenedesmus: 1.002gr de NaHCO₃; 344.33 mg DW/l

El valor de K_{La} de la Especie Scenedesmus igual a 10.71 d^{-1} . El máximo valor calculado de OPR es igual a $140.02 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$. La tasa máxima de producción de oxígeno por peso seco de algas es $P_{O_2, \text{máx}} = 0.41 \text{ mgO}_2.\text{mg}^{-1}\text{DW}.\text{d}^{-1}$.

La tasa total de oxígeno producida fue 81.54 mg, este valor es bastante bajo si se compara con la producción de oxígeno teórica, este valor se obtiene por

estequiometria, (Ver 3.5.3). Al sistema se añadió la cantidad de 727.7 mg de HCO_3 , por lo tanto se obtiene que la cantidad teórica de oxígeno producido, es 497.0 mg O_2 , se concluye con estos resultados que solo el 16.4% fue recuperado, del total teórico esperado.

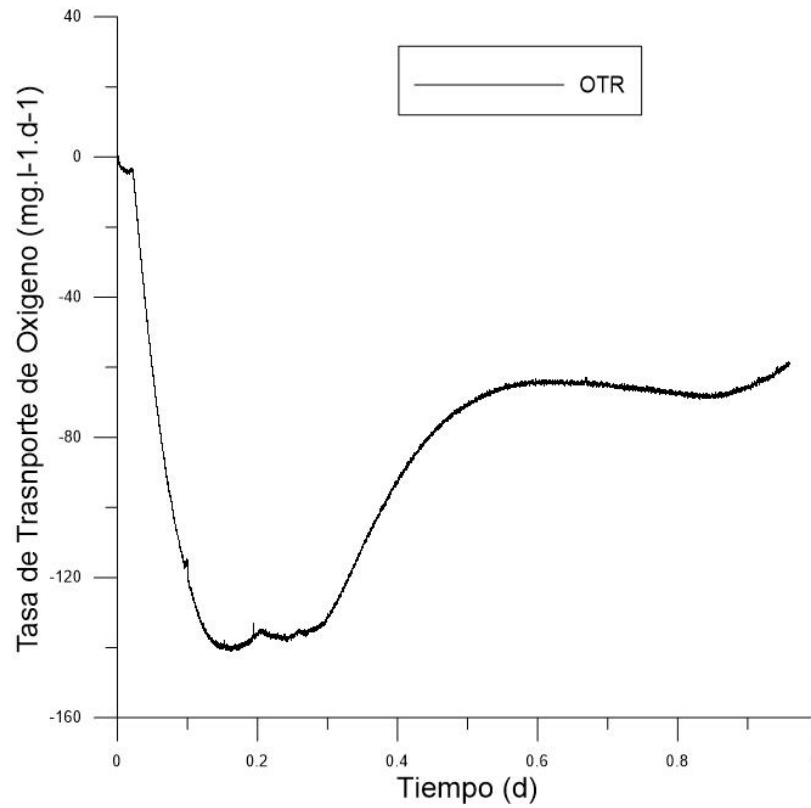


Figura 4.8 OTR del experimento de respirometría de la **Figura 4.8**Figura 4.7

De los datos calculados, se presenta la tabla 4-4, una síntesis de los resultados para el experimento de la *Figura 4.7*

OPR max ($\text{mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	$P_{\text{O}_2,\text{max}}$ ($\text{mgO}_2.\text{mg}^{-1}\text{DW}.\text{d}^{-1}$)	Oxígeno Producido ($\text{mgO}_2.\text{l}^{-1}$)	K_La (d^{-1})
140.02	0.41	81.54	10.71

Tabla 4-3 Resumen de los datos Calculados de la **Figura 4.7** de respirometría

4.2.3.2 Titulación

Los resultados para la titulación obtenidos son: TPAR es igual al valor de $10.48 \text{ mg.l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. En la **Figura 4.9** Resultado de Respirometría y titulación aplicado a la familia Scenedesmus. el valor de BSAR igual $0.14 \text{ mg.l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, se tiene que HAR igual $10.304 \text{ mg.l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. El valor de HAR expresado por peso seco de algas (DW), presente al inicio del experimento, igual a $223.00 \text{ mg DW.l}^{-1}$, siendo denominado P_H y dando como resultado igual a $0.05 \text{ mg.l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

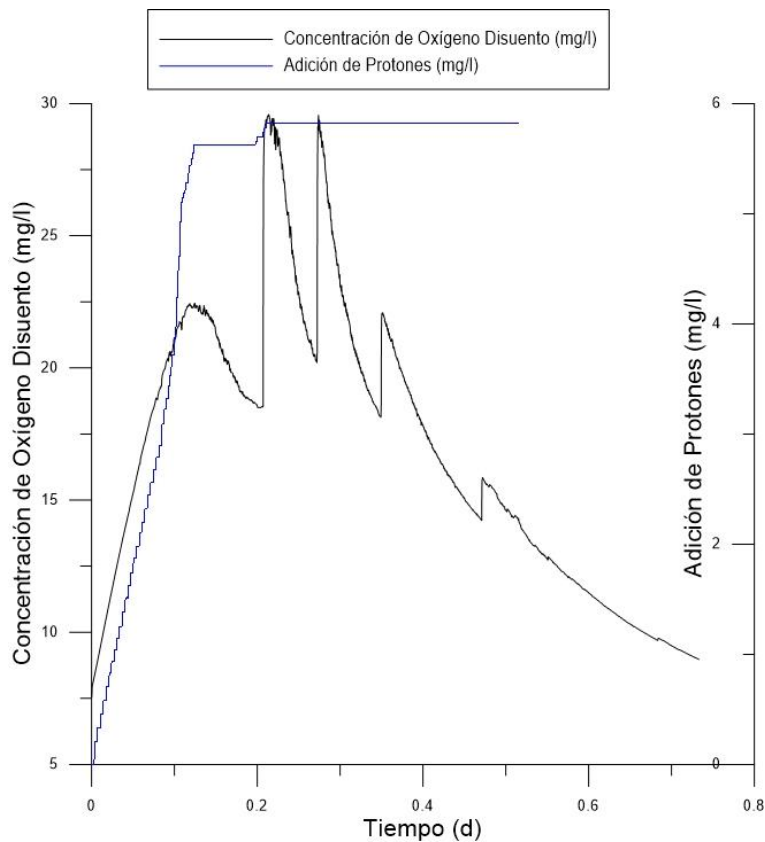


Figura 4.9 Resultado de Respirometría y titulación aplicado a la familia Scenedesmus.

En la tabla 4-5 se observa el resumen de los valores obtenidos luego de realizar el experimento de titulación en la microalga Scenedesmus.



HAR ($\text{mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	P_H ($\text{mgO}_2.\text{mg}^{-1}\text{DW}.\text{d}^{-1}$)	BSAR ($\text{mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	Protones añadidos ($\text{mg H}^+.\text{l}^{-1}$)
7.07	0.03	0.12	0.4

Tabla 4-4 Resumen de los Valores del experimento de Titulación en la microalga *Scenedesmus*

4.2.3.3 Influencia del bicarbonato en la producción de oxígeno

En la **Figura 4.10** Resultado de respirometría con diferentes cantidades de bicarbonato y una cierta cantidad de microalgasse **Figura 4.10** Resultado de respirometría con diferentes cantidades de bicarbonato y una cierta cantidad de microalgasmuestra los experimentos de respirometría con diferentes cantidades de bicarbonato, añadidos al reactor. En estos experimentos la concentración de microalgas no es constante, esto fue determinado a través de peso seco de la solución de algas y turbiedad.

De la *Figura 4.10* se puede observar que a mayor cantidad de bicarbonato añadido al sistema, mayor y más prologando será el tiempo de consumo y la producción de oxígeno. El valor de $K_L a$ de la pendiente del perfil de oxígeno disuelto es de 12.1 d^{-1} para el valor de 1006 mg de bicarbonato, y para la curva de 750 mg de bicarbonato un valor de 9.18 d^{-1} . El máximo valor calculado de OPR es igual a $183.12 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$, que corresponde al experimento de 1006 mg de bicarbonato mientras que para el segundo el máximo valor de OPR es $90.1 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$. La máxima tasa de producción de oxígeno producción de oxígeno por peso seco de algas: $P_{\text{O}_2, \text{max}}$ ($\text{mgO}_2.\text{mg}^{-1}\text{DW}.\text{d}^{-1}$) es igual a $2.24 \text{ mg O}.\text{DW}.\text{d}^{-1}$, y para el otro experimento es de $0.67 \text{ mg O}.\text{DW}.\text{d}^{-1}$; esto debido a que la concentración de algas fue mayor. La cantidad total de producción de oxígeno fue de 92.87 mg y 44.71 mg de oxígeno respectivamente, siendo estos valores bajos en comparación con la producción de oxígeno teórica, ya que al sistema se añadió la cantidad de 730.6 mg de HCO_3^- y 544.7 mg de HCO_3^- por lo tanto la cantidad teórica de oxígeno producida es 372.2 mg y 498.99 mg respectivamente. Se concluye con estos resultados que solo el 12% para el



experimento que contiene 750mg de bicarbonato de sodio y de 18.6 % para el experimento que contiene 1006mg de bicarbonato de sodio fue recuperado.

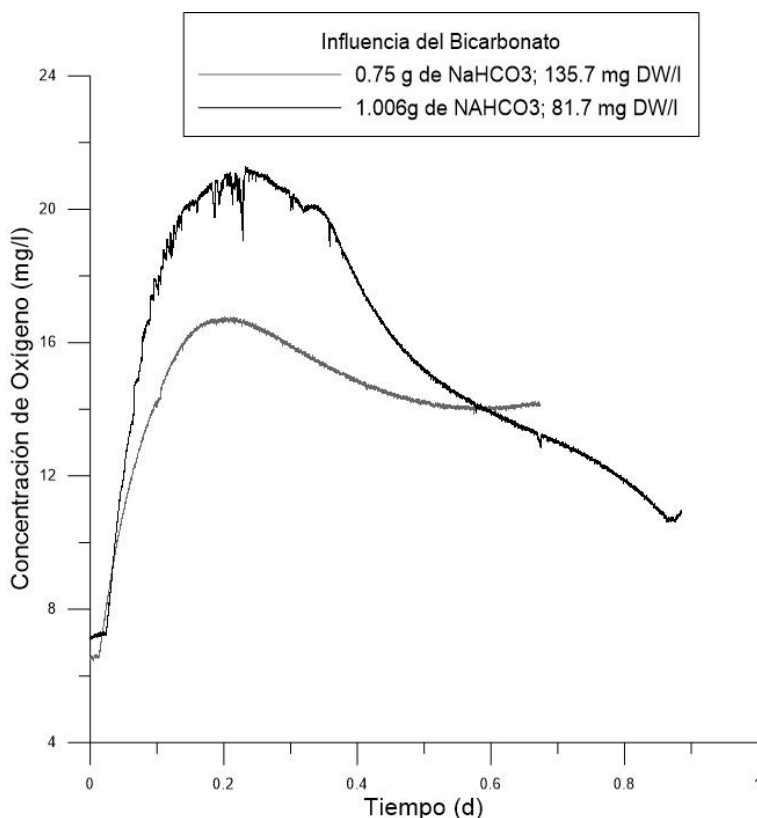


Figura 4.10 Resultado de respirometría con diferentes cantidades de bicarbonato y una cierta cantidad de microalgas

NaHCO ₃ (mg)	OPR max (mg.l ⁻¹ .d ⁻¹)	P _{O₂} ,max (mg O ₂ .mg ⁻¹ DW.d ⁻¹)	Oxígeno Producido (mgO ₂ .l ⁻¹)	K _L a (d ⁻¹)
1006	183.12	2.24	92.87	12.1
750	90.1	0.67	44.71	9.18

Tabla 4-5 Resumen de valores obtenidos a partir de los datos de respirometría de la figura 4.10

4.2.4 Influencia de la cantidad de luz

Para esta prueba se tuvieron que realizar 2 experimentos con la misma cantidad de bicarbonato y una determinada concentración de microalgas. Los resultados están presentados en la Figura 4.11. En el primer experimento se tiene como condiciones iniciales: 1604 LUX y una concentración de 135 mg DW/l, mientras que para el segundo experimento de la misma figura las condiciones iniciales son: 2780 LUX y 245 mg DW/l. Se puede ver claramente que la que obtuvo mayor cantidad de luz durante el experimento, produjo mayor concentración de oxígeno dentro del reactor. La variación entre el máximo OPR es de 79.3 mg/l aproximadamente, entre los 2 experimentos, ya que el OPR_{max} alcanzado por el experimento que contiene mayor radiación de luz es de $169.13 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$, mientras para que el de menor radiación de luz apenas de $90.10 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$

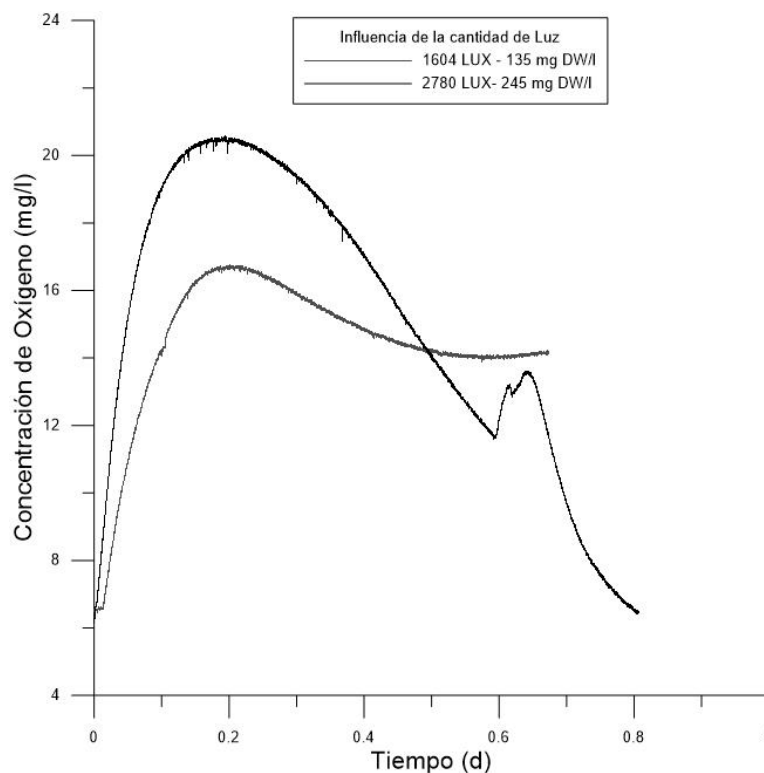


Figura 4.11 Influencia de la cantidad de luz con la misma cantidad de bicarbonato

En la tabla 4-7 se resume los valores obtenidos de la influencia de cantidad de luz, se pueden observar claramente que a mayor cantidad de luz, presente en el reactor



la concentración de oxígeno y la tasa de producción de oxígeno ascienden. Estos valores comparados con los valores de producción de oxígeno teóricos se consigue obtener apenas el 15.8% de oxígeno para el primer experimento y el 9% apenas para el segundo experimento. Este último fue notablemente menor con respecto a los otros experimentos realizados.

Cantidad de luz (LUX)	OPR max (mg.l ⁻¹ .d ⁻¹)	P _{O₂,max} (mg O ₂ .mg ⁻¹ DW.d ⁻¹)	Oxígeno Producido (mgO ₂ .l ⁻¹)	Kla (d ⁻¹)
2780	169.13	0.3	81.1	12.42
1604	90.10	0.7	46.2	9.18

Tabla 4-6 Resumen de cálculos de la influencia de la cantidad de luz.

4.2.4.1 Influencia de la cantidad de biomasa

Para este tipo de experimento se agregó la misma cantidad de bicarbonato con diferentes cantidades de biomasa, la determinación de la biomasa se lo realizó con el procedimiento descrito en el capítulo **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** En el perfil se puede notar que a mayor cantidad de biomasa el OPR es mayor, se adicionó pequeñas cantidades de bicarbonato para obtener experimentos en periodos más cortos de tiempo.

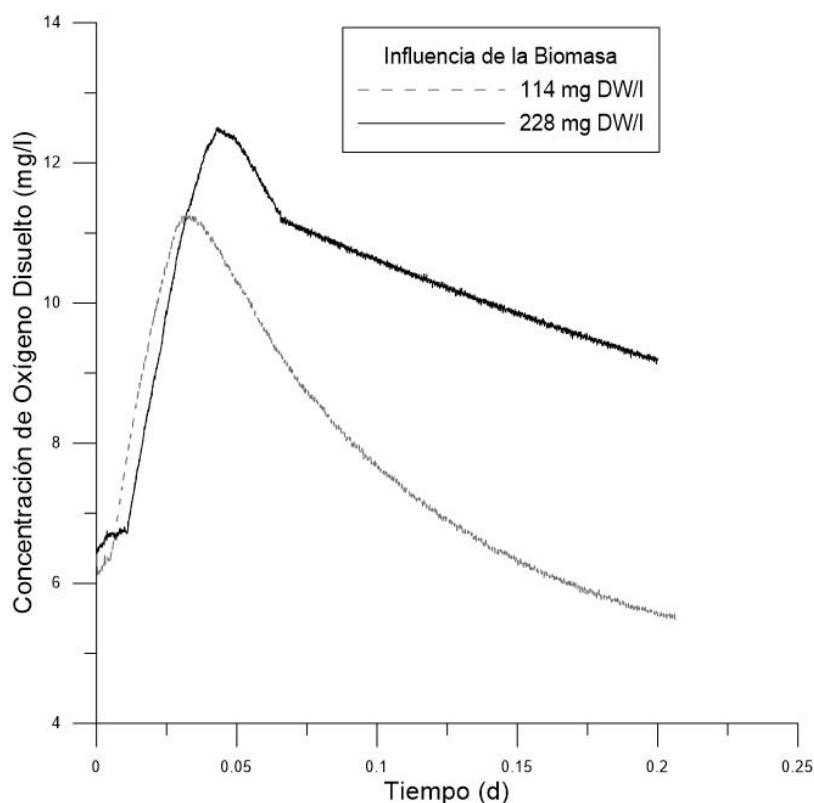


Figura 4.12 Influencia de la cantidad de biomasa.

A continuación se tiene la tabla resumen de los 2 experimentos desarrollados, debido a la pequeña cantidad de bicarbonato dosificada, se puede observar valores menores en comparación con experimentos anteriores. Los valores de la tabla resumen fueron obtenidos a partir de los cálculos y de la gráfica de OPR y OTR, los mismos que fueron calculados a partir de experimentos con la familia Scenedesmus, variando únicamente la concentración de microalgas de 114g DW/l y de 228mg DW/l.

Cantidad de biomasa mg DW.l ⁻¹	OPR max (mg.l ⁻¹ .d ⁻¹)	P _{O₂,max} (mg O ₂ .mg ⁻¹ DW.d ⁻¹)	Oxígeno Producido (mgO ₂ .l ⁻¹)	Kla (d ⁻¹)
114	50.74	0.45	3.62	11.72
228	56.77	0.25	6.57	10.20

Tabla 4-7 Resumen de cálculos de la influencia de la cantidad de biomasa

4.2.5 Resultados de la Especie 1

El resultado del ensayo de Respirimetría aplicado a la especie 1, fue obtenido luego de la adición 0.7500 g de bicarbonato (NaHCO_3) disueltos en 50ml de agua destilada, al inicio del experimento el reactor tiene una cantidad de luz de 1700 Lux, medida con el luxómetro. Luego de la toma de una muestra puntual del reactor para obtener el valor de la turbiedad fue de 18.72 NTU, la concentración de microalgas determinada es de 74.5 mg DW/l. Previo al experimento se debió ser sometida a centrifugación para conseguir separar del medio de cultivo, en el que se encuentra. Al final del experimento el valor de la turbiedad fue igual a 23.82 NTU.

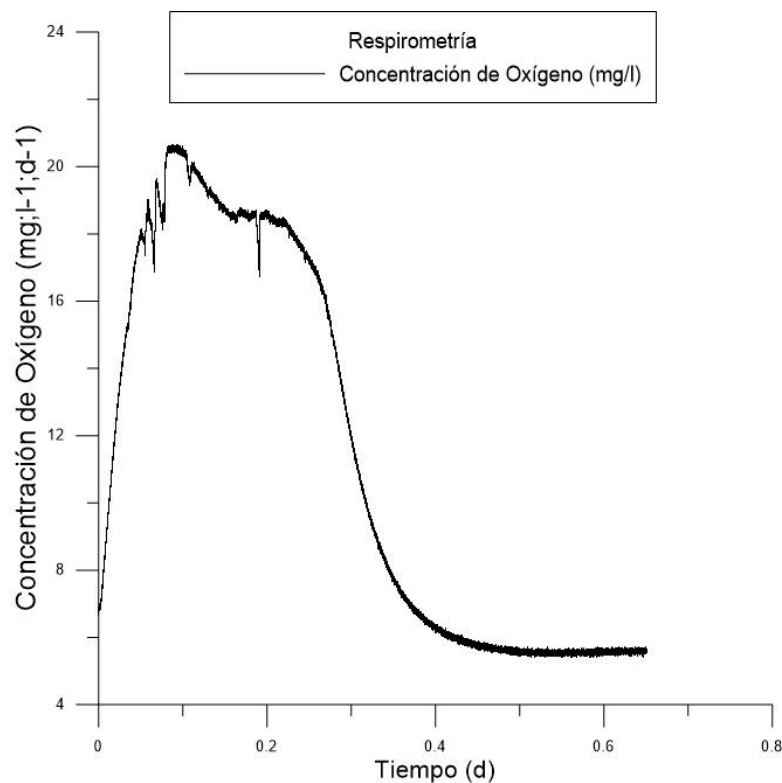


Figura 4.13 Resultado de Respirimetría aplicado a la Especie 1

El presente resultado tiene similitud con el perfil de las familias de microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus*. Para el presente experimento se utilizó 0.7501g de

NaHCO_3 equivalente a 0.54 gramos de HCO_3 agregados al sistema constituido de 3100 ml de solución de algas.

4.2.5.1 Determinación de la Tasa de Producción de Oxígeno.

Al igual que los procedimientos anteriores descritos para la obtención de la tasa de producción de oxígeno, se obtuvo antes la *Figura 4.14* de respirometría

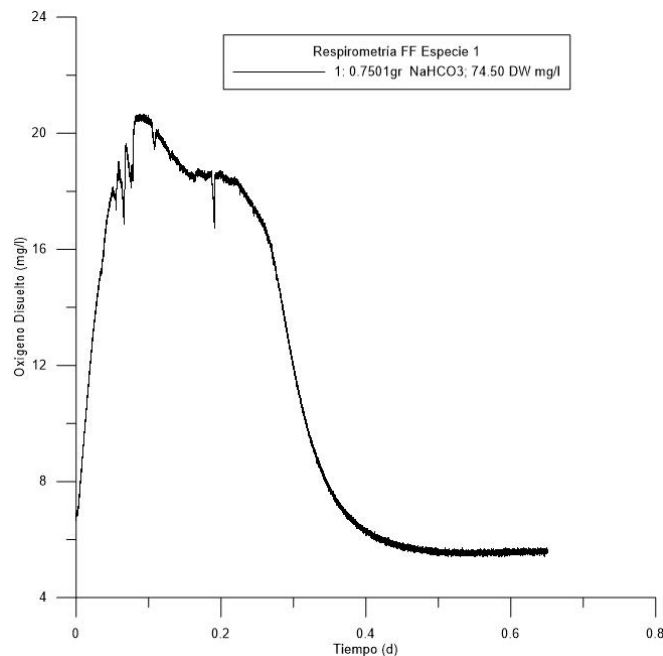


Figura 4.14 Resultado de Curva respirométrica de microalga FF Especie 1: 0.7501gr de NaHCO_3 ; 74.50 DW mg/l

Se agregó un pulso de bicarbonato de sodio de 0.750 gramos disueltos en 50 ml de agua destilada con un pH de 7.5 El reactor tiene una cantidad de luz igual a 1700 Lux.

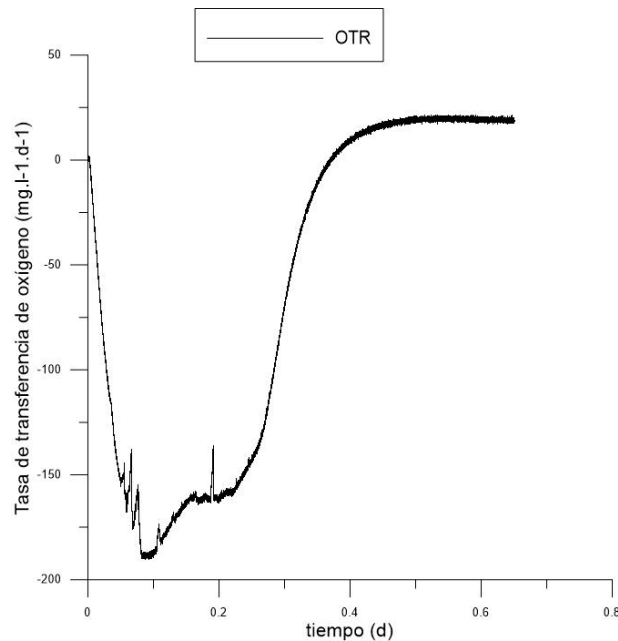


Figura 4.15 OTR del experimento de respirometría de la **Figura 4.14**

El valor de K_{La} es 13.9 d^{-1} . El máximo valor calculado de OPR es igual a $191,0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ .d}^{-1}$. La tasa máxima de producción de oxígeno expresado por peso seco de algas, $P_{O_2, \text{max}}$ ($\text{mgO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{DW} \cdot \text{d}^{-1}$) es igual a $2.56 \text{ mg O}_2 \cdot \text{DW} \cdot \text{d}^{-1}$. Se calculó el valor de la tasa total de oxígeno producida igual a 44.72 mg . Al sistema se añadió la cantidad de 544.7 mg de HCO_3 , por lo tanto se obtiene la cantidad teórica de oxígeno producida, es 372.06 mg de oxígeno que debería ser producido, pero de este total tan solo 12% fue recuperado.

OPR max ($\text{mg.l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	$P_{O_2, \text{max}}$ ($\text{mgO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{DW} \cdot \text{d}^{-1}$)	Oxígeno Producido ($\text{mgO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$)	K_{La} (d^{-1})
191.01	2.56	44.72	13.90

Tabla 4-8 Resumen de los datos Calculados de la **Figura 4.14** de respirometría

4.2.5.2 Titulación

Los resultados de titulación para la Especie 1 obtenidos son: La tasa total de adición de protones representada por (TPAR) que es igual al valor de $5.8 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$. En la Figura 4.9 Resultado de Respirometría y titulación aplicado a la familia Scenedesmus. se observa que sigue una pendiente mucho menor, luego del consumo del recurso de carbono, este valor es el BSAR igual $0.21 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$. El valor (HAR) o tasa de adición de protones, igual $5.59 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Este último valor HAR se expresado en concentración de peso seco de algas (DW), tiene un valor de $269.84 \text{ mg DW.l}^{-1}$, siendo denominado P_H obteniéndose igual a $0.03 \text{ mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

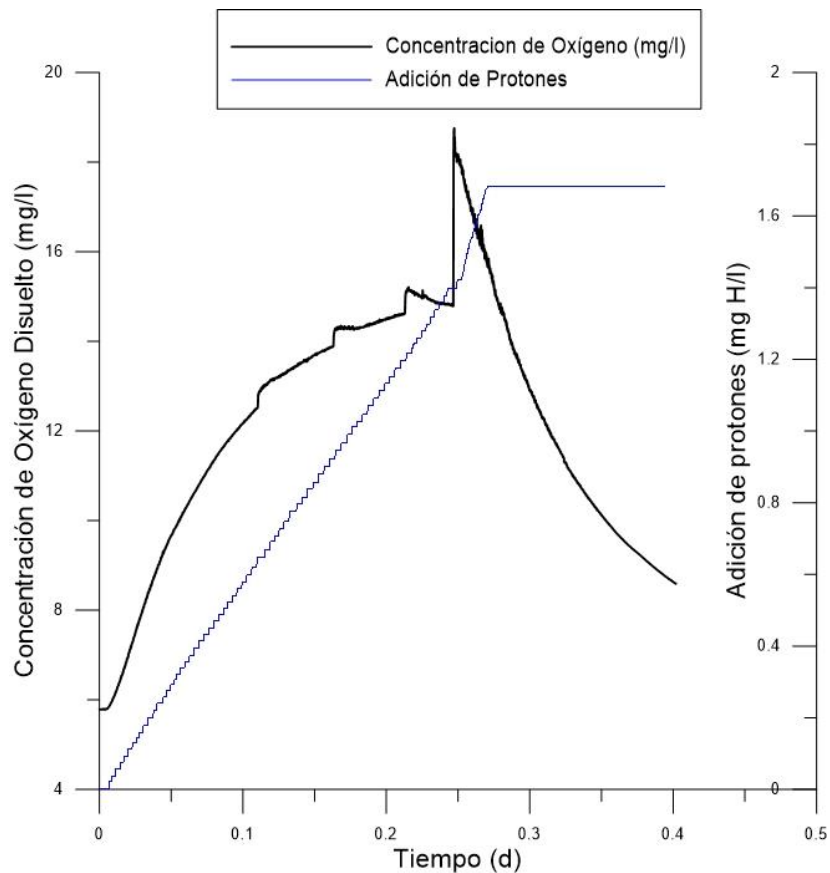


Figura 4.16 Ejemplo de Respirometría y Titulación de la especie # 1

En la **Tabla 4-9** se puede observar el resumen de los valores obtenidos luego de realizar el experimento de titulación en la Especie #1.



HAR ($\text{mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	P_H ($\text{mgO}_2.\text{mg}^{-1}\text{DW}.\text{d}^{-1}$)	BSAR ($\text{mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	Protones añadidos ($\text{mg H}^+.\text{l}^{-1}$)
191.01	2.56	44.72	0.42

Tabla 4-9 Resumen de los Valores del experimento de Titulación en la Especie #1

4.3 Comparación de Resultados entre las microalgas Chlorella, Scenedesmus y FF Especie #1

Se realizaron experimentos entre las distintas familias bajo las mismas condiciones para las especies indicadas. Las condiciones que cumplieron fueron: tener la misma cantidad de Luz igual 2700 Lux, y la misma cantidad de recurso de carbono, tendiéndose 0.75 gramos de bicarbonato de Sodio, equivalentes a 0.54 gramos de HCO_3 . A partir de estas condiciones iniciales se obtienen los perfiles de concentración de oxígeno disuelto mostrados en la *Figura 4.17*.

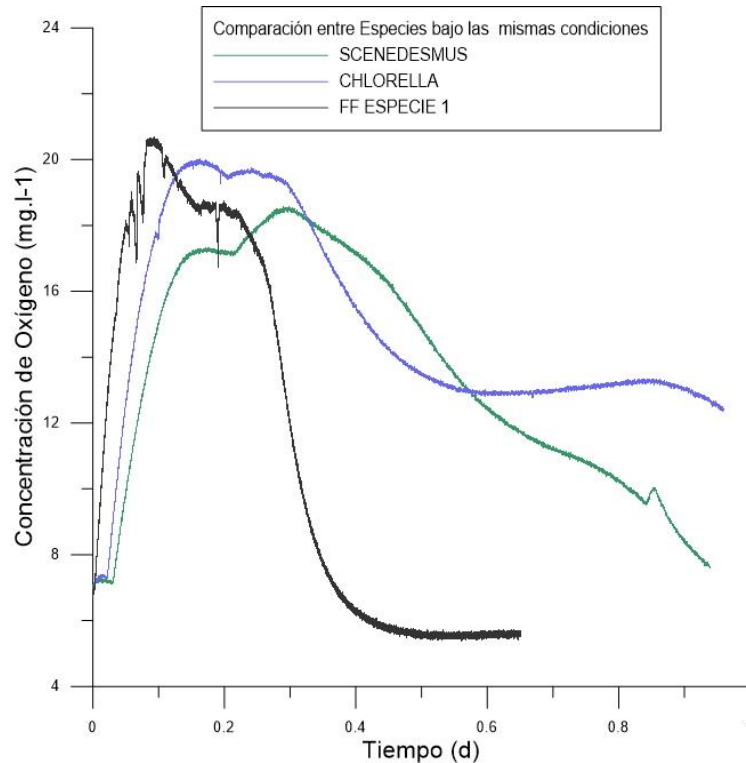


Figura 4.17 Concentración de Oxígeno Disuelto medido en varias familias de microalgas

Se puede observar que la especie #1 produce una mayor concentración de oxígeno, pero por un tiempo mucho menor a las otras familias de microalgas. Se observa además que la Especie #1 cuando se agota el recurso de carbono tiene un descenso rápido. La familia Scenedesmus tiene una mayor fase estacionaria en el consumo del bicarbonato en un rango entre 0.18 y 0.4 de día aproximadamente. Chlorella presenta una producción de oxígeno mayor pero muy similar a la especie Scenedesmus; las dos familias tienen comportamientos muy parecidos. En la tabla 4-10 se tiene el resumen de valores calculados para las tres familias analizadas.

Especie	OPR max (mg.l ⁻¹ .d ⁻¹)	P _{O₂,max} (mg O ₂ .mg ⁻¹ DW.d ⁻¹)	Oxígeno Producido (mgO ₂ .l ⁻¹)	KLa (d ⁻¹)
Scenedesmus	141.29	0.41	81.54	10.71
Chlorella	152.18	2.95	82.52	13.09
Especie #1	190.67	2.56	44.72	13.90



Tabla 4-4-10 Resumen de los datos calculados del perfil respirométrico de la Figura 4.17

En los experimentos respirométricos realizados se obtuvo el valor de K_{La} oscila entre un rango comprendido entre 9.1 - 13. El promedio obtenido de los K_{La} es de 11.4 d^{-1} , que según Janssens (2009) está dentro del rango de (0.24-14.4). Se realizó un promedio del valor de K_{La} para cada especies: Scenedesmus con un valor de: 10.8 d^{-1} , para la familia Chlorella un valor de 11.41 d^{-1} y para la Especie 1 de 10.6 d^{-1} .

Se obtiene una mayor producción de oxígeno en los experimentos donde se tiene mayor cantidad de luz. La máxima actividad fotosintética con una cantidad de luz de 2700 LUX fue de $2 \text{ mg O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ DW} \cdot \text{d}^{-1}$ en promedio para las 3 especies estudiadas. En esta comparación establecida bajo condiciones de luz, bicarbonato, agitación y temperatura se destaca que la familia Chlorella tiene mayor productividad de oxígeno, seguida de la familia Scenedesmus y finalmente la Especie 1, aunque esta última alcanzó un pico superior, se puede observar que también alcanza un descenso bastante rápido, cuando se ha agotado la fuente de carbono disponible.

4.4 Relación entre Turbiedad y concentración de peso Seco de microalgas.

Para cada experimento se tomó la turbiedad al inicio y al final del experimento, y además se determinó la concentración de peso seco de microalgas, con lo que se llevó a cabo una correlación entre las 2 medidas, y se obtuvo los siguientes resultados. En la **Figura 4.18** se observa los experimentos realizados para la familia Chlorella, con su respectiva correlación, se tiene que la función obtenida es:

$$Y_c = 3.06 \cdot x - 8.54, \quad \text{Ec. 4.2}$$

Dónde:

Y_c = concentración de microalgas de la Familia Chlorella [mg DW/l]

x = Turbiedad [NTU]

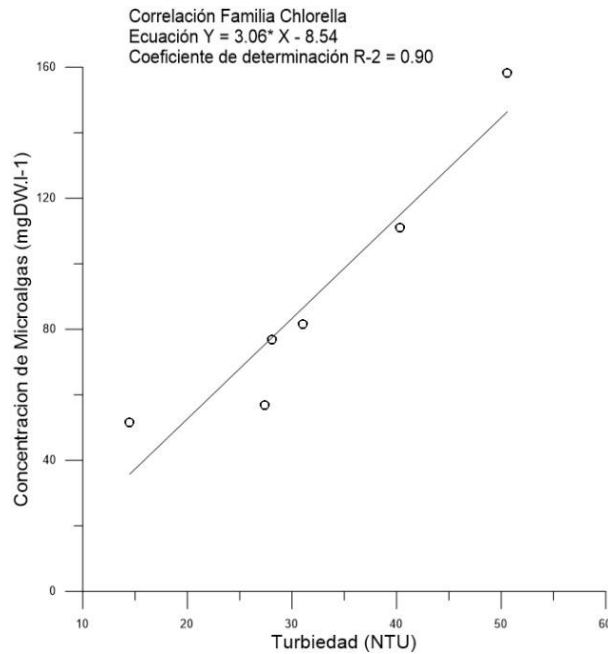


Figura 4.18 Concentración de algas familia Chlorella vs Turbiedad

En el gráfico 4.18 se puede observar que existe una correlación muy alta, que permitirá realizar una estimación cualitativa de la concentración de biomasa a partir de la medición de la turbiedad.

En el caso de la familia Scenedesmus se obtuvo la siguiente función:

$$Y_s = 2.19 \cdot x + 39.33, \quad \text{Ec. 4.3}$$

Donde:

Y_s = concentración de microalgas de la Familia Scenedesmus [mg DW/l]

x = Turbiedad [NTU]

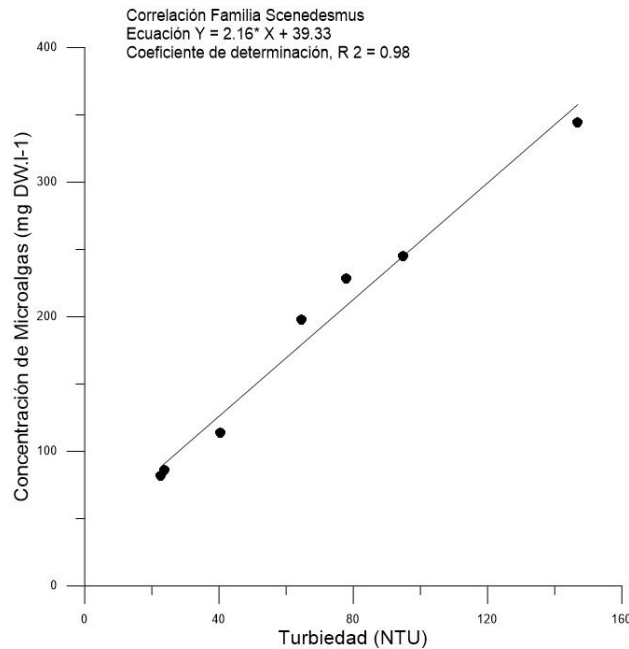


Figura 4.19 Concentración de algas de la Familia Scenedesmus vs Turbiedad

En los experimentos realizados para esta especie, existe menos variación entre valores por lo tanto mayor relación entre las medidas.

Finalmente, en el gráfico Figura 4.20 expresa la correlación obtenida a partir de los resultados de la Especie 1, la función es:

$$Y_1 = 3.02 \cdot x + 19.28,$$

Donde:

Y_1 = concentración de microalgas de la Especie 1 [mg DW/l]

x = Turbiedad [NTU]

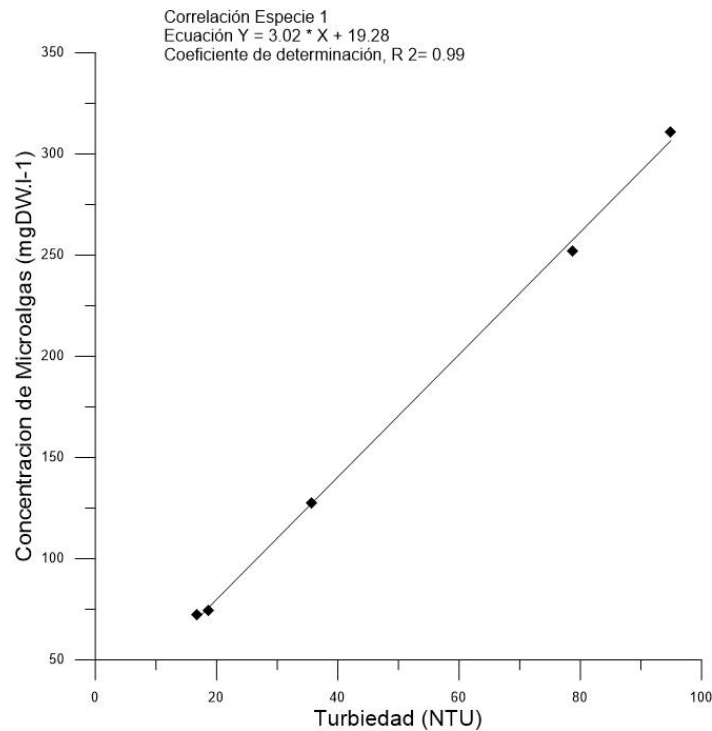


Figura 4.20 Concentración de algas de la Especie 1 vs Turbiedad

En la **Figura 4.20** aunque son más esporádicos los experimentos realizados se tienen una mayor relación entre las dos medidas, se ve claramente la tendencia que sigue. Por lo tanto mayor precisión, cuando se desee obtener la concentración de microalgas a partir de la turbiedad.

Siendo así la turbiedad una medida mucho más rápida, fácil e instantánea. El coeficiente de determinación para la familia Chlorella es de 0.90. EL coeficiente para la familia Scenedesmus es de 0.98 y la Especie 1 tiene un coeficiente de determinación igual a 0.99. Los resultados nos indican que a través de la función determinada con valores de turbiedad se puede estimar la concentración del peso seco de las microalgas, de manera muy aproximada.

Especie	Ecuación de correlación	R ²
Chlorella	$Y_c \text{ (mg DW/l)} = 3.06 * x - 8.54$	0.90
Scenedesmus	$Y_s \text{ (mg DW/l)} = 2.19 * x + 39.33$	0.98
Especie #1	$Y_1 \text{ (mg DW/l)} = 3.02 * x + 19.28$	0.99

Tabla 4-4-11 Resumen de las funciones de correlación de las especies analizadas.



CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La automatización y la configuración del ensayo de respirometría junto a la titulación en las microalgas, permitió la determinación de los parámetros biocinéticos de las microalgas, con diversas variables como la disponibilidad de luz, la cantidad de bicarbonato y la concentración de biomasa.
- Se realizó las pruebas para la obtención de parámetros cinéticos en las familias Chlorella, que es utilizada muy a menudo para investigaciones, familia Scenedesmus y Especie 1. Se observa en las familias estudiadas que a mayor cantidad de bicarbonato se obtiene mayor producción de oxígeno.
- En todos los ensayos se obtuvo una tasa de respiración menor a la teórica, que fue determinada de manera estequiométrica de acuerdo a las ecuaciones planteadas en la literatura. Esto debido a que no se consideró la respiración nocturna, la fotorrespiración y la limitación de luz propias de cada especie. Por lo que se recomienda tomar en cuenta estos procedimientos para nuevas investigaciones, en la producción de oxígeno y el consumo de recursos de carbono.
- Los experimentos donde se utilizó una mínima cantidad de bicarbonato, se llevó a cabo en aproximadamente 0.16 días (4 horas). En estas pruebas no se puede distinguir fácilmente los procesos que se dan: producción de oxígeno el inicio de la prueba, una fase estacionaria y finalmente un descenso cuando todo el recurso de carbono fue consumido.
- Se observó que la turbiedad, tiene una alta correlación con la cantidad de biomasa presente en el reactor, en el caso de los experimentos con el peso seco de las algas.



- Se recomienda que los sensores estén calibrados para cada experimento, así se evitará datos erróneos en la medición. Y obtener resultados óptimos para su correcta interpretación. Además en el experimento de titulación se recomienda utilizar un ácido de menor concentración, para estabilizar el pH, otro punto importante, es que luego de dosificado el ácido se debe esperar un tiempo para volver a tomar la medida de pH. Otro punto importante podría ser la implementación de sensores para la medición de dióxido de carbono y nitrógeno, para realizar las mediciones respectivas de manera continua y así obtener una estimación de variabilidad del consumo para dichos componentes y el comportamiento de los microorganismos.
- Se sugiere considerar la intensidad de saturación de luz, ya que esta es diferente para cada especie. En la presente tesis se utilizó la misma cantidad de luz para cada especie siendo los resultados satisfactorios, en cuando a la producción de oxígeno y crecimiento de microalgas.



REFERENCIAS

- Alvarado, A. (2013). Advanced dynamic modelling of wastewater treatment ponds. (PhD), Ghent University, Belgium.
- Alvarado, A. (2014). Clase para Tratamiento de Aguas Residuales.
- Alvarez, F. (2002). Filtros verdes. Un sistema de depuración ecológico Ingeniería Hidráulica y Ambiental, XXII(1).
- Cabrera, C. M. A., & Pulla, T. M. F. (2014). Línea base para el aprovechamiento de microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual.
- Decostere, B., & Janssens, N. (2013). A combined respirometer-titrimeter for the determination of microalgae kinetics: Experimental data collection and modelling. Chemical Engineering Journal, 222, 85-93.
- Gonzales, L. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. Bioresource Technology.
- Guisasola, A. (2005). Respirometría con aireación continua. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 80, 388-396.
- Henze, M. (2008). Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design. London: IWA Publishing.
- Janssens, N. (2009). Characterization Of Algal Diversity And Kinetics In Waste Stabilization Ponds. Spatial distribution of the algae in the WSP.
- Janssens, N. (2009). Characterization Of Algal Diversity And Kinetics In Waste Stabilization Ponds. Spatial distribution of the algae in the WSP.
- Janssens, N. (2010). Characterization of Algal Diversity and Kinetics in waste stabilization ponds.
- Lavoie, N. (1985). Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*. A new approach for wastewater biological tertiary treatment? Water Res., 19.



- Mantecón, R. (1991). Depuración de aguas residuales de origen urbano mediante técnicas de infiltración rápida en el suelo. Simposio del Agua en Andalucía, III, 391-401.
- Mara, D. (2003). Domestic Wastewater Treatment in Developing Countries. London: EARTHSCAN.
- Mara, D. (2013). Domestic wastewater treatment in developing countries: Routledge.
- Mendoza, S. R. (2000). Sistemas de lagunas de Estabilización.
- Morató, J. (2006). Tecnologías sostenibles para la potabilización y el tratamiento de aguas residuales. REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACION, 3.
- Morgan, B., & Lahav, O. (2007). The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe (II) oxidation by O₂ in aqueous solution—basic principles and a simple heuristic description. Chemosphere, 68(11), 2080-2084.
- Organización Mundial de la Salud y UNICEF. (2007). La meta de los ODM relativa al agua potable y el saneamiento: El reto del decenio para zonas urbanas y rurales.
- Peñafiel, R. A. G. (2014). Evaluación de la calidad del agua del río Tomebamba mediante el índice ICA del Instituto Mexicano de tecnología del agua.
- Piñera, A. K. R. (2002). Manual para el Cultivo de Microalgas. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S.
- por el Agua, A. (2008). Manual de Depuración de Aguas Residuales Urbanas. Monográficos Agua en Centroamérica, Ideasamares.
- Rengel, A. (2000). Agua para Consumo Humano: Tratamiento de Aguas Residuales Cuenca.
- Richmond, A. (1988). Handbook of microalgal mass culture. Florida: CRC Press.
- Rodríguez, A. (2009). Lagunas de Estabilización.
- Romero, M. (2009). Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 25.



- Ruiz Martinez, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente.
- Shilton, A. (2005). Pond Treatment Technology. UK: IWA
- Sperling, M. (2007). Basic Principles of Wastewater Treatment: IWA Publishing.
- Unicef. (2008). Estado Mundial de la Infancia 2009: Resumen Ejecutivo: UNICEF.
- Valencia, A. (2013). Diseño de un sistema de tratamiento para las aguas residuales de la cabecera parroquial de San Luis - Provincia de Chimborazo. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Riobamba.
- Vanrolleghem, P. A., & Spanjers, H. (1998). A hybrid respirometric method for more reliable assessment of activated sludge model parameter. *Water science and technology*, 37(12), 237-246.
- Wolf, G., Picioreanu, C., & van Loosdrecht, M. (2007). Kinetic modeling of phototrophic biofilms: The PHOBIA model. *Biotechnology and bioengineering*, 97(5), 1064-1079.
- Yáñez, F. (1993). Lagunas de estabilización: teoría, diseño, evaluación y mantenimiento Lagunas de estabilización: teoría, diseño, evaluación y mantenimiento: IEOS.
- .



ANEXOS

Anexo 1. Control de Bicarbonato, Nutrientes y pH de la familia Chlorella.

LABORATORIO DE SANITARIA
FACULTAD INGENIERIA CIVIL

FUNDADA EN 1867
UNIVERSIDAD DE CUENCA

CONTROL DE CRECIMIENTO

REALIZADO POR:

ESPECIE:

FECHA	HORA	Bicarbonato	COMIDA			PH	OBSERVACIONES
			NPK	Carbonato	Volumen		
Viernes 27/03/15	10:40	0,2195	0,3599			Cultivo	
Jueves 19/03/15	15:07	0,2149	0,3563			Cultivo	
Viernes 13/03/15	09:30	0,2105	0,3551			Cultivo	
Viernes 06/03	12:00	0,2190	0,3599			Cultivo	
Jueves 26/02	17:50	0,2157	0,3518			Cultivo	
Jueves 19/02	10:10	0,2164	0,3573			Cultivo	
Mar 03/02	09:49	0,2160	0,3549			Cultivo	
Mar 27/01	09:50	0,2136	0,3560			Cultivo	
Lunes 19/01	10:15	0,2150	0,3550			Cultivo	
Lunes 12/01	09:40	0,2163	0,3560			Cultivo son alta turbiedad	
Lunes 05/01	09:14	0,2182	0,3516			Cultivo se reinicia con normales (0,200ml)	
Miércoles 17/12	11:50	0,2194	0,1708			Cosecha y cultivo spess	
Viernes 28/11	16:30	0,2110	0,1715			Cosecha y cultivo	
Viernes 21/11	16:30	0,2146	0,1783			Cosecha y cultivo	
Jueves 13/11	09:55	0,2147	0,1719			Cultivo sedimentos de spess	



Control de Bicarbonato, Nutrientes y pH de la familia Scenedesmus

LABORATORIO DE SANITARIA
FACULTAD INGENIERIA CIVIL

FUNDADA EN 1867
UNIVERSIDAD DE CUENCA

CONTROL DE CRECIMIENTO

REALIZADO POR:

ESPECIE:

FECHA	HORA	Bicarbonato o	COMIDA			PH	OBSERVACIONES
			NPK	Carbonato	Volumen		
Jueves 19/09	10:50	0,1497	0,2751	0,9litros		Cosecha y cultivo	
Jueves 25/09	11:00	0,1483	0,2764	0,9litros		Cosecha y cultivo	
Viernes 03/10	10:06	0,1475	0,2789	0,9litros		Cosecha y cultivo	
Viernes 07/10	10:19	0,0203	0,5497	0,5litros		Cosecha y cultivo con inóculo dado por Zayas	
Lunes 13/10	16:00	0,1094	0,1655	1,5litros		Gallo Cultivo con inóculo	
Lunes 20/10		0,2118	0,3546	3,5litros		Cosecha y Cultivo	
Jueves 01/11	16:40	0,2168	0,3589	3,5litros		Cosecha y Cultivo	
Viernes 14/11	14:26	0,2189	0,3583	3,5litros		Cosecha y Cultivo	
Jueves 20/11	17:30	0,2185	0,3596	3,5litros		Cosecha y Cultivo	
Viernes 05/12		0,2104	0,3514	3,5litros		Cosecha y Cultivo	
Martes 16/12	16:00	0,2197	0,3547	3,5litros		Cosecha y Cultivo	
Jueves 03/01	09:30	0,2195	0,3508	3,5litros		Cultivo conó protocolo de reactivos EDNI	
Lunes 19/01	09:45	0,2172	0,3544	3,5litros		Cultivo biomasa pH en fermentador	
Viernes 21/01	09:59	0,2185	0,3567	3,5litros		Cultivo	
Jueves 29/01	09:25	0,2190	0,3584	3,5litros		Cultivo	
Jueves 05/02	10:20	0,2127	0,3595	3,5litros		Cultivo	



Control de Bicarbonato, Nutrientes y pH de la familia Scenedesmus

LABORATORIO DE SANITARIA
FACULTAD INGENIERIA CIVIL

FUNDADA EN 1867
UNIVERSIDAD DE CUENCA

CONTROL DE CRECIMIENTO										
REALIZADO POR: <u>Mariela Rojas</u>										
ESPECIE: <u>Especie 3</u>										
FECHA	HORA	Bicarbonat o	COMIDA			Volumen	PH	OBSERVACIONES		
			NPK	Carbonato						
Jueves 20/11	17:30	0,2385	0,3653			3,5 litros		Cultivo y cosecha		
Jueves 18/12	09:58	0,2313	0,3692			3,5 litros		Cultivo y cosecha		
Jueves 05/01	09:42	0,2377	0,3664			3,5 litros		Cultivo se levanta con 100 ml		
Lunes 12/01	08:49	0,2374	0,3667			3,5 litros		Cultivo con biomasa alta en turbiedad		
Miércoles 21/01	09:55	0,2351	0,3617			3,5 litros		Cultivo		
Jueves 29/01	09:45	0,2393	0,3670			3,5 litros		Cultivo		
Jueves 25/02	10:10	0,2325	0,3693			3,5 litros		Cultivo		
Jueves 12/02	10:06	0,2344	0,3691			3,5 litros		Cultivo		
Jueves 19/		0,2362	0,3658			3,5 litros		Cultivo		
Jueves 26/02	18:05	0,2337	0,3675			3,5 litros		Cultivo		
Viernes 06/03		0,2379	0,3623			3,5 litros		Cultivo		
Miércoles 18/03		0,2373	0,3667			3,5 litros		Cultivo		
Viernes 27/03	10:34	0,2399	0,3660			3,5 litros		Cultivo		



Anexo 2. Control de Bicarbonato adicionado a los Experimentos

UNIVERSIDAD DE CUENCA FACULTAD DE INGENIERIA									
CONTROL ESPECIE	Mariela Rojas CHLORELLA								
HORA	FECHA	NUTRIENTES	CARBONATO	BICARBONATO	CANTIDAD BIOMASA	PH	LUZ en	OBSERVACIONES	
	23/02			1,025		7,57	2187	Experimento # 6	
	24/02			0,7002		7,50	1872	Experimento # 7	
	25/02			0,3526		7,51	1530	Experimento # 9	
	26/02			0,1528		7,5	1700	Experimento # 9	
				0,05		7,5	2030	Experimento # 10	
				0,050		7,5	2400	Experimento # 11	
	27/02			1,0038		7,52	1870	Experimento # 12	
	02/03			1,0052		7,6	659	Experimento # 13	
	03/03		1,0033			7,59	1870	Experimento # 14	
	04/03			1,0017		7,51	733	Experimento # 15	
	05/03			1,0064		7,5	1123	Experimento # 16	
	21/03			0,3508		7,5		Titulación Ch	



UNIVERSIDAD DE CUENCA									
FACULTAD DE INGENIERIA									
CONTROL ESPECIE		Manela Rojas SCENEDESNIUS							
HORA	FECHA	NUTRIENTES	CARBONATO	BICARBONATO	CANTIDAD BIOMASA	PH	LUZ	OBSERVACIONES	
	06/03			1,0020		7,5	1720	Experimento #17	
	07/03		1,0054			7,5	1716	Experimento #18	
	09/03			0,7505		7,5		Experimento #19	
	10/03			0,7508		7,6	2780	Experimento #20	
	11/03			0,7506		7,4	1604	Experimento #21	
	12/03			0,7508		7,5	1608	Experimento #22	
	13/03			0,0532		7,5	2900	Experimento #23	
	20/03			0,3507		7,5		Titulación	



UNIVERSIDAD DE CUENCA FACULTAD DE INGENIERIA												
CONTROL	Manela Rojas											
ESPECIE	TF ESPECIE I											
HORA	FECHA	NUTRIENTES	CARBONATO	BICARBONATO	CANTIDAD BIOMASA	PH	LUZ	OBSERVACIONES				
	14/03			0,0521			2700	Experimento #24				
	16/03			0,7501			2700	Experimento #25				
	18/03			0,052			2700	Experimento #26				
	18/03			0,0524			2700	Experimento #27				
	25/03			0,35			2700	Experimento #28				
	26/03			0,35			2700	Experimento #29				
	17/03			0,3503		7,5	2700	Tubación #1				
	19/03			0,3501		7,5	2684	Tubación #2				



Anexo 3. Datos de Turbiedad y Concentración de Algas

Relación turbiedad y concentración de Algas Chlorella		
Experimentos	Turbiedad (NTU)	Concentración (mg DW/l)
6	16,06	58,00
7	39,67	90,00
8	24,67	93,00
9	31,02	81,67
10	40,37	111,00
11	27,38	57,00
13	50,59	158,33
14	14,4	51,67
15	28,12	77,00

Relación turbiedad y concentración de Algas Chlorella		
Experimentos	Turbiedad	Concentración
16	22,71	81,67
17	146,82	344,33
18	23,83	85,67
19	74,01	211,67
20	94,91	245,011461
21	44,48	135,724608
22	64,63	198,00
23	40,5	114,00
24	77,88	228,00



Relación turbiedad y concentración de Especie 1		
Experimentos	Turbiedad	Concentración
25	18,72	74,50
26	16,72	72,33
27	94,92	311,00
28	35,66	127,33
29	78,79	252,00