



ESTUDIO DE LA INCORPORACIÓN DE DIFERENTES GEOMETRÍAS EN UN FOTOBIORREACTOR A ESCALA DE PLANTA PILOTO Y SU IMPACTO EN EL CULTIVO DE LA *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

P. M. Alegría, G. A. Alvarado, A. A. Barahona, R. M. Prieto, E.H. Ramos¹

¹Departamento de Procesos y Ciencias Ambientales, UCA, San Salvador, El Salvador
E-mail: eramos@uca.edu.sv

Resumen—Se diseñó y se construyó un fotobiorreactor tubular vertical de material acrílico para cultivar dentro de los parámetros de las condiciones óptimas la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, alga que representa un problema ambiental al Embalse Cerrón Grande, con el objetivo de generar una propuesta para el uso de la cianobacteria y crear los cimientos preliminares para estudios posteriores dada la escasa información disponible en el país. Durante la puesta en marcha del fotobiorreactor, se monitoreó el pH, lux, temperatura y densidad celular con relación al tiempo, alcanzando una razón de producción máxima de biomasa de 0.23 g/l día en el quinto día de cultivo. El medio de cultivo inicial fue seleccionado por su alta compatibilidad con algas taxonómicamente similares a la *Microcystis aeruginosa*, sin embargo, posteriormente fue reformulado específicamente para el alga en estudio por cuestiones de adaptabilidad. Se inyectó CO₂ gaseoso como fuente de carbono para el alga y se implementaron diferentes configuraciones internas en el fotobiorreactor con la finalidad de mejorar la transferencia de dióxido de carbono (CO₂) al medio de cultivo acuoso. La configuración seleccionada fue el de placa plana, sin embargo, debido al estrés que ocasiona el movimiento de ascenso y descenso dentro del fotobiorreactor a las colonias del alga, se optó por utilizar la configuración sin ningún cuerpo interno.

Las condiciones de operación para el adecuado crecimiento de la *Microcystis aeruginosa* son presentados a continuación: pH de 6.66-9.60; temperatura de 26.1-33.5 °C; una concentración de 10-16 %v/v de CO₂ con un promedio en tiempo de inyección de 5.2 minutos y caudal de 1 l/min, una iluminancia de 1927 a 6620 lux y una razón de medio de cultivo Zarrouk modificado (sin bicarbonato) 1:10 con respecto al volumen dentro del fotobiorreactor. El cultivo exitoso del alga tuvo una duración de 7 días a partir de una concentración inicial de alga de 0.15 g/l hasta una concentración máxima de 1.610 g/l.

Palabras Clave — dióxido de carbono, fotobiorreactor, *Microcystis aeruginosa*.

Abstract — A vertical tubular photobioreactor of acrylic material was designed and constructed to cultivate within the parameters of the optimal conditions the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, algae that represents an environmental problem to the Embalse Cerrón Grande, with the aim of generating a proposal for the use of cyanobacteria and create preliminary foundations for further studies given the limited information available in the country. During the start-up of the photobioreactor, the pH, lux, temperature and cell density were monitored in relation to time, reaching a maximum

biomass production ratio of 0.23 g / l day on the fifth day of cultivation. The initial culture medium was selected for its high compatibility with taxonomically similar algae to *Microcystis aeruginosa*, however, it was subsequently reformulated specifically for the algae under study for adaptability issues. CO₂ gas was injected as a carbon source for the algae and different internal configurations were implemented in the photobioreactor in order to improve the transfer of carbon dioxide (CO₂) to the aqueous culture medium. The configuration selected was that of a flat plate, however, due to the stress caused by the movement of ascent and descent within the photobioreactor to the algae colonies, it was decided to use the configuration without any internal body.

The operating conditions for the proper growth of *Microcystis aeruginosa* are presented below: pH 6.66-9.60; temperature of 26.1-33.5 °C; a concentration of 10-16% v / v CO₂ with an average injection time of 5.2 minutes and flow rate of 1 l / min, an illuminance from 1927 to 6620 lux and a ratio of modified Zarrouk culture medium (without bicarbonate) 1:10 with respect to the volume inside the photobioreactor. The successful cultivation of the algae lasted 7 days from an initial concentration of algae of 0.15 g / l to a maximum concentration of 1,610 g / l.

Keywords — carbon dioxide, photobioreactor, *Microcystis aeruginosa*.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, uno de los objetivos comunes para todas las naciones es obtener una fuente de energía asequible no contaminante, tomar acción por el clima y disminuir el vaciado de las fuentes de combustible fósil, lo que ha motivado a encontrar nuevas alternativas como los biocombustibles. A pesar de ello, la generación a gran escala de dicho recurso conlleva altos requerimientos de biomasa vegetal como materia prima, que, a largo plazo, recaería en problemas de escases y seguridad alimenticia a nivel mundial. A respuesta de ello, han surgido alternativas factibles como la obtención de biomasa a partir de microalgas, debido a que sus productividades superan a los cultivos agrícolas convencionales, no requieren su instalación en amplias extensiones de terreno fértil, ni agua de riego, y además poseen la capacidad de transformar dióxido de carbono a oxígeno.



El Humedal Cerrón Grande es un lago artificial creado con fines de generación de energía hidroeléctrica en El Salvador, ubicado entre los departamentos de San Salvador, Cuscatlán y Cabañas. Para la investigación se escogió la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* como alga en estudio, por representar un problema ambiental al Embalse Cerrón Grande y por la baja exigencia de condiciones que ella requiere para su desarrollo, a pesar de la escasa información disponible e investigaciones previas realizadas en el país [1].

Actualmente, la calidad del agua es demasiado baja debido al vertido de contaminantes orgánicos e inorgánicos en mayor medida por los ríos que confluyen en el cuerpo de agua: Acelhuate, Sucio y Suquiapa. Dicho estado, involucra la incidencia de eutrofización causando proliferación de cianofíceas y microalgas que en conjunto alcanzan un total de 157 a 897 toneladas de microalgas en el área del embalse con un pH mayor a 9.4 [1]

Para poder cultivar algas, se requieren una serie de componentes específicos para su crecimiento y desarrollo como: la luz solar, fuentes de carbono y agua con características similares a su medio de origen; esto conlleva la dificultad de simular un medio de cultivo con condiciones parecidas a la de su ecosistema para su reproducción. El beneficio en la implementación de fotobiorreactores cerrados radica en el control completo de las condiciones a las que es expuesta la cepa, por lo que su desarrollo exitoso depende de su diseño y correcta implementación, razón que hace necesaria la investigación y determinación de los parámetros adecuados para la construcción de un fotobiorreactor en el que se cultive *Microcystis aeruginosa* [2].

Además los fotobiorreactores cerrados tienen la ventaja de ser ubicados con facilidad, ocupando espacios reducidos en comparación con otras formas de cultivo agrícola y prescindiendo de recursos hídricos, los cuales pueden llegar a ser sustituido, inclusive, por aguas residuales, aguas salobres derivada de la extracción de petróleo, gas natural u otras sustancias e incluso pueden cultivarse con el fin de depurar los gases de combustión de caldera bunker, para mitigar el efecto ambiental que estos gases tiene al medio ambiente y de esa forma disminuir la huella de carbono [2]

En la presente investigación, no se ha encontrado en la bibliografía consultada trabajos detallados sobre el diseño, estudio y cultivo de la *Microcystis aeruginosa* en un fotobiorreactor (FBR). Por lo tanto, se proponen como objetivos para este trabajo: a) Diseño y construcción de un FBR tubular vertical a escala de laboratorio para el cultivo de la *Microcystis aeruginosa*, utilizando diferentes geometrías internas, b) determinar las condiciones de operación de un FBR para el cultivo exitoso de la *Microcystis aeruginosa* y c) Determinar la tasa de

crecimiento del alga cultivada utilizando el FBR diseñado y las condiciones de operación previamente determinadas.

II. METODOLOGÍA

A. Diseño y construcción del fotobiorreactor

El material utilizado para la construcción del fotobiorreactor fue acrílico, ya que sus propiedades se adaptan a las condiciones de crecimiento de la microalga.

Para determinar las dimensiones del fotobiorreactor de columna simple (Fig. 1.a), se realizó un escalamiento partiendo de un modelo disponible en la universidad, cuyas dimensiones eran de 19.72 cm de diámetro y 183 cm de largo. El diámetro, altura y espesor del fotobiorreactor utilizado es de 10.78 cm, 100 cm y 3×10^{-3} cm, respectivamente.

Por otra parte, se construyeron dos configuraciones adicionales: una en la que se colocó una placa plana transversal (Fig. 1.a) y una configuración con un tubo concéntrico (Fig. 1.b), con el objetivo de generar una mayor difusión de gases en el sistema y un mayor tiempo de residencia del gas, evitando así gradientes de concentración de los sustratos alimentados. Para estas configuraciones, las dimensiones de la placa fueron 9.5 cm de ancho por 60 cm de largo (Fig. 1.a) y para el tubo concéntrico fueron 6 cm de diámetro y 60 cm de altura (Fig. 1.b).

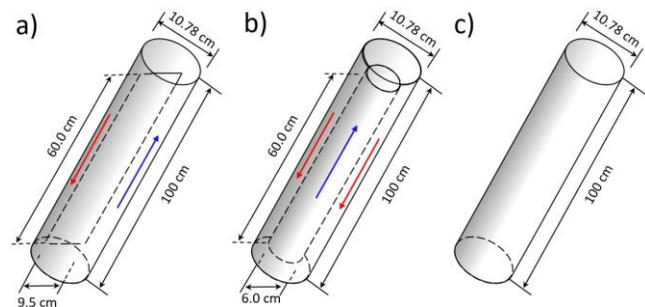


Fig. 1. Diferentes geometrías internas y patrones de flujo en un FBR tubular vertical, utilizadas para el crecimiento a escala de laboratorio de la *Microcystis aeruginosa*. Configuraciones: a) Placa transversal, b) tubo concéntrico y c) columna simple.

La configuración de flujo para las dos geometrías adicionales (tubo y placa) son mostradas en la Fig. 1. El flujo ascendente se muestra por flecha azules y flujo descendente por flechas rojas. El tubo simple no tiene un patrón de flujo bien definido, debido a la turbulencia generada, pero se asemeja a la configuración de tubo concéntrico.

El cálculo del volumen de llenado, se realizó mediante la Ec. (1) [3]:



$$V_{op} = [0.7 \text{ a } 0.9] \cdot \pi \cdot R^2 \cdot H \quad (1)$$

En donde, V_{op} : volumen de llenado; π : constante con un valor de 3.1416; R: radio del fotobiorreactor y H: altura del fotobiorreactor. El factor de diseño (valor entre corchetes en la Ec. 1) utilizado fue el promedio de ambos, es decir 0.8, al sustituir en la Ec. (1), se obtiene un volumen de llenado de $9.127 \times 10^{-3} \text{ m}^3$.

B. Diseño y construcción del sistema de dosificación aireada de dióxido de carbono

El diseño consiste en introducir a un mezclador (M-110) una corriente de dióxido de carbono puro (G-111) y otra de aire (G-112), con el propósito de homogenizar la mezcla a la concentración de dióxido de carbono deseada. Una vez homogenizada, la corriente pasa por un flujómetro (K-211) y finalmente, el flujo de gas es dividido en dos corrientes, una de ellas es utilizada para medir y monitorear la concentración de dióxido de carbono y la otra (punto de muestreo), es la corriente que se introduce al fotobiorreactor (R-210). En la Fig. 2, se muestra el diagrama del proceso correspondiente. La codificación AM, AH y V corresponden a accesorios de acople rápido macho, acople rápido hembra y válvula, respectivamente.

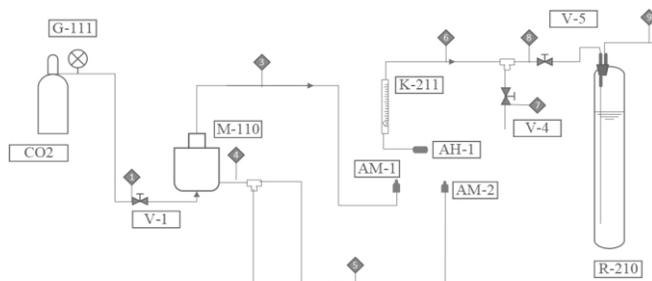


Fig. 2. Sistema de inyección de mezcla de gases.

Se utilizó dióxido de carbono con una concentración de 99.90%. Dado que las concentraciones de dióxido de carbono utilizadas para el experimento fueron relativamente bajas en un rango de 12-15% V/V, el flujo inyectado también lo fue, manteniéndose entre 1 y 2 L/min.

En el diseño del sistema de inyección de gases al mezclador, se tuvo en consideración las densidades de los gases, es decir, el dióxido de carbono por ser más denso, es inyectado desde el fondo del mezclador con el propósito que el aire, el cual es inyectado desde el otro extremo, arrastre el dióxido de carbono en una distribución de flujo en paralelo con trayectoria circular.

Para las tres configuraciones internas del FBR, se fijó un flujo de 2.5 L/min, a una concentración de dióxido de carbono al 18%. Así mismo se midió la concentración de pH al inicio y al final en el medio de cultivo líquido.

Para determinar la configuración que presentaba mejor solubilidad de dióxido de carbono, se realizaron mediciones de concentración cada minuto durante los primeros cinco minutos de experimentación, luego la medición fue realizada cada cinco minutos, hasta que la concentración no presentara ningún cambio.

C. Cultivo del alga *Microcystis aeruginosa*.

Previo al cultivo, se procedieron a realizar diversos lavados al alga proveniente del Embalse del Cerrón Grande con el objetivo de, eliminar cualquier presencia de sólidos disueltos y material orgánico indeseado. Para esto se aprovechó la condición de flotabilidad que posee la *Microcystis aeruginosa*. Para efectuar los lavados se procedió en primer lugar a dejar reposar la muestra en un embudo de separación durante 18 horas, para obtener la suspensión total del alga y obtener una fase líquida inferior libre de alga, pero conteniendo el material orgánico del lago. El proceso mencionado se ilustra en la Fig. 3.

Con el alga debidamente lavada y libre de agentes externos, se prosiguió a tomar 2 réplicas de 10 ml de muestra para determinar la concentración global en g/l (gramos de alga seca por litro de volumen). Para obtener dicha concentración fue necesario utilizar el método de peso seco, por lo que, las muestras se colocaron en dos crisoles (10 ml de muestra de alga en cada crisol) e introducirlos a un horno durante 14 horas a 105 °C. Luego de conseguir la concentración global, se tomaba el volumen necesario de la muestra de alga pura para obtener una concentración de 0.15 g/l dentro del fotobiorreactor de columna vertical. Por otro lado, el alga que no se utilizaba para el cultivo se mantenía en reposo con inyección constante de aire a 0.37 l/min a través de, un compresor y de esta manera, se aseguraban condiciones naturales para el mantenimiento del alga.

El medio de cultivo utilizado para el proceso de crecimiento fue el de Zarrouk Modificado, ya que, es de especial interés basado en el tiempo en que se dobla la población de diversas algas [3]. Las cantidades sugeridas de compuestos inorgánicos en el medio Zarrouk Modificado, para un litro de solución, son las siguientes: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.20 g; EDTA (Na), 0.08 g; NaHCO_3 , 16.80 g; KNO_3 , 2.50 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g; K_2SO_4 , 1.00 g; K_2HPO_4 , 0.50 g; NaCl , 1.00 g; H_2O , aforo [4]. Es necesario mencionar que, a partir de observaciones y datos obtenidos durante la experimentación, se utilizó el Medio Zarrouk Modificado exceptuando de este, el bicarbonato de sodio; pues, la adición de dicho compuesto en conjunto con

dióxido de carbono gaseoso, generaba muerte celular en la *Microcystis aeruginosa*.

La cantidad volumétrica a utilizar de medio de cultivo Zarrouk Modificado va de la mano con el volumen de aforo a utilizar en el cultivo, por lo tanto, se optó por trabajar con la proporción de 0.1 litros de medio de cultivo por litro de aforo; en este caso, como el aforo en el fotobiorreactor de columna vertical es de 8 litros, se agregaron 0.8 litros de medio de cultivo Zarrouk Modificado.

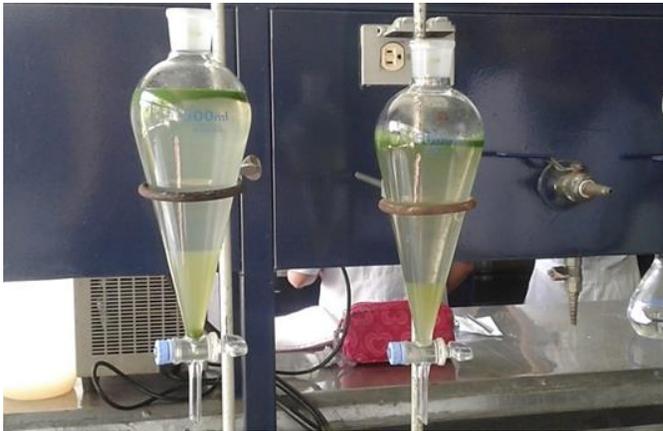


Fig. 3. Suspensión de *Microcystis aeruginosa* en embudos de separación.

La puesta en marcha del cultivo de *Microcystis aeruginosa* consistió en monitorear dentro del fotobiorreactor el pH del cultivo, caudal de la mezcla gaseosa CO₂-aire (l/min), concentración de CO₂ (%v/v) medido con el equipo Multitec 545 marca SEWERIN, tiempo de inyección de mezcla gaseosa CO₂-aire (s), temperatura en el cultivo (°C) e iluminancia (lux), registrada con un luxómetro LX1330B. Durante el día, los parámetros fueron medidos a las 09:00, a las 12:00 y la última a las 16:00. El pH óptimo del cultivo se debe encontrar entre 7-8; el flujo de gas debe presentar un caudal volumétrico máximo de 1 l/min; la concentración de CO₂ se debe de mantener entre 15% a 18% v/v [3], el tiempo de inyección de la mezcla gaseosa debe ser durante 7 minutos; la temperatura se debe encontrar entre 23 °C a 27 °C [5]; por último, la iluminancia se debe mantener entre 1500-2000 luxes [5]. Cabe destacar que, las inyecciones de mezcla gaseosa CO₂-aire se realizaron a las 09:00, a las 12:00 y a las 16:00. Luego de cada inyección con la mezcla gaseosa, el cultivo se dejó con un flujo constante de aire no mayor a 1 l/min con el objetivo de, mantener una mezcla homogénea de los nutrientes y el alga en el fotobiorreactor. Asimismo, durante la noche, el cultivo de alga se mantuvo con inyección constante de aire hasta las 09:00 del siguiente día.

Finalmente, se determinaron las concentraciones de alga durante los días cultivo y el proceso para obtenerlas fue el

siguiente: se tomaban 2 muestras de alga a cierto volumen (V), en este caso, fueron de 10 ml cada una y se tomaban ambas muestras a las 09:00, a las 12:00 y a las 16:00; luego, se introducían en diferentes embudos de separación y se aplicaba el método del lavado de alga antes expuesto; una vez obtenidas las muestras de alga sin impurezas, se introducían en diferentes crisoles y se ejecutaba el método de peso seco; la masa del crisol (MC) y la masa de crisol más alga (MCA) fueron medidas a través de una balanza analítica; por último, la concentración del alga (CA) en el día de cultivo se determinó mediante la Ec. (2).

$$CA = \frac{MCA - MC}{V} \quad (2)$$

Cabe mencionar que de manera simultánea se realizó un cultivo con una muestra testigo, en la que se buscaba comparar si había una mejor tasa de reproducción en condiciones naturales o de laboratorio, pero similares. Para esto se mantuvo una muestra traída del Embalse únicamente con aireación, que proporcionaba agitación suave y oxigenación.

Por otra parte, se realizaron análisis a través de un microscopio para verificar el crecimiento de la *Microcystis aeruginosa* y realizar conteos de las colonias en el momento del análisis a lo largo de todo el cultivo.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Pruebas de absorción de CO₂ en diferentes geometrías

Para determinar la geometría interna (placa transversal, tubo concéntrico y columna simple) con la que se da una mejor solubilidad de dióxido de carbono, se realizó un estudio basado en el estado de equilibrio termodinámico. En este caso, se busca que la concentración de dióxido de carbono permanezca constante a la salida del fotobiorreactor. La configuración que presentó un menor tiempo de saturación está implícitamente relacionado a un menor consumo de dióxido de carbono y una mejor transferencia de masa dentro del fotobiorreactor, lo que implica que se obtenga un mejor mezclado.

1) Tiempos de saturación

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en cada geometría, utilizando 18%v/v de concentración inicial de CO₂ y un flujo de 2.5 L/min. En la tabla IV se muestran las concentraciones de dióxido de carbono a la salida del fotobiorreactor. En la Fig. 4. se grafica el cociente de la concentración inicial y final para cada geometría.



TABLA I
Concentración de CO₂ a la salida del fotobiorreactor en las tres configuraciones estudiadas.

Tiempo (minutos)	Concentración CO ₂ Columna Simple (% v/v)	Concentración CO ₂ Placa Transversal (% v/v)	Concentración CO ₂ Tubo Concéntrico (% v/v)
1	7	11	4
2	11	15	7
3	13	17	9
4	14	18	11
5	15	18	11
10	16	18	14
15	16	-	15
20	17	-	17
25	18	-	18
30	18	-	18
35	18	-	18

TIEMPOS DE SATURACIÓN

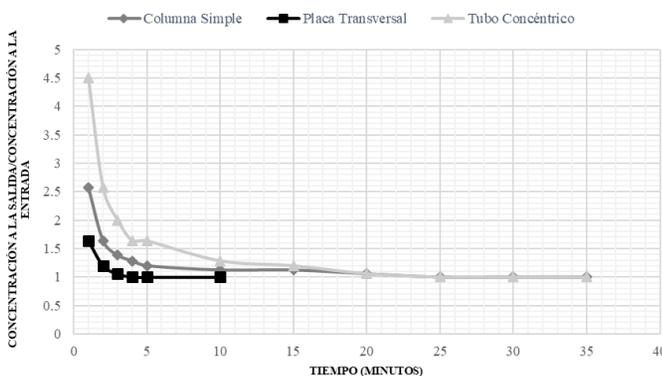


Fig. 4. Tiempos de saturación para las distintas configuraciones internas en un fotobiorreactor de tubo vertical.

El comportamiento del pH en las diferentes geometrías se describe a continuación: en la columna simple, el pH al inicio del experimento fue de 7.06, una vez finalizado, el pH disminuyó a un valor de 5.84; en la placa transversal el pH obtenido al inicio del experimento fue de 7.39, una vez finalizado, el pH disminuyó a un valor de 5.86 y, por último, en el tubo concéntrico se obtuvo un pH inicial de 7.30 y un pH final de 5.88

De acuerdo al gráfico de la Fig. 4, la concentración de la geometría de columna simple tiene un comportamiento constante a partir de los 25 minutos, es decir, la saturación es alcanzada al transcurrir los 25 minutos; es importante destacar que el pH tuvo una disminución de 1.22 en un

período de 35 minutos que fue la duración del experimento. En la placa transversal, la saturación es alcanzada a los 4 minutos; en esta configuración el pH disminuye un valor de 1.53 en un período de 10 minutos. Finalmente, la configuración de tubo concéntrico la saturación es alcanzada al transcurrir los 25 minutos. El tiempo en alcanzar la saturación es el mismo que el obtenido en la columna simple. En esta configuración el pH disminuye en 1.42 en un período de 35 minutos.

Al realizar el análisis del gráfico de la Fig. 4, la configuración en la que ocurrió la mejor solubilidad de dióxido de carbono es la de la placa transversal, el tiempo para llegar a la saturación es de 4 minutos, asimismo, es la configuración en donde la disminución de pH es mayor y se da en un menor tiempo con respecto a las otras geometrías. Cabe destacar que, la configuración de columna simple y tubo concéntrico alcanzan la saturación en el mismo período de tiempo.

La *Microcystis aeruginosa* es una cianobacteria que se agrupa en colonias de diferentes tamaños, debido a ello y de acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento de absorción de CO₂, la configuración que presenta la mejor solubilidad es en la placa transversal, sin embargo, debido al estrés que ocasiona el movimiento de ascenso y descenso dentro del fotobiorreactor a las colonias del alga, se optó por utilizar la configuración de columna simple ya que no se presenta un mezclado con esfuerzos cortantes intensos que disgregue las colonias de *M. aeruginosa*.

B. Cultivo y crecimiento de *Microcystis aeruginosa*.

1) Determinación de la razón de medio de cultivo en las pruebas de crecimiento.

Se prepararon 3 beakers con diferentes concentraciones de medio Zarrouk (3.6, 14.6, 29.2 y 100% v/v) y se agregó una cierta cantidad de alga a cada uno de ellos. Después de 72 horas de experimentación se realiza la metodología del peso seco al alga dentro de los beakers de 600 ml, obteniéndose el mayor crecimiento en el cultivo con 29.2 %v/v de medio Zarrouk modificado (sin bicarbonato). En el beaker con medio al 100 %v/v se obtuvo una concentración final de alga de 0.16 g/l, en el aforo con medio de 3.6 %v/v se obtuvo 0.19 g/l, en el aforo con medio al 14.6 %v/v se obtuvo 0.23 g/l y en el aforo con medio al 29.2 %v/v se obtuvo 0.36 g/l.

Una vez determinadas las concentraciones, se establecieron las razones de medio de cultivo equivalentes a la proporción de volumen puro de medio Zarrouk modificado (sin bicarbonato) sobre volumen de cultivo. Por ejemplo, el volumen del medio puro utilizado para preparar la solución de 29.2% v/v fue de 40 ml de medio puro, en ese



mismo sentido, el volumen de cultivo fue de 400 ml dentro del beaker. Al realizar la proporción mencionada anteriormente, se obtiene una razón de medio de cultivo de 0.1 ml de medio puro sobre ml de cultivo.

Los resultados de las razones de medio de cultivo se resumen en la Tabla II. Debido al poco crecimiento ocurrido en el aforo con medio puro al 100% v/v, su razón de cultivo no se expone en dichos resultados. A pesar de que en la literatura se presenta como medio de cultivo el Zarrouk modificado, este no puede utilizarse directamente en el cultivo de la *M. aeruginosa* debido a que provoca la muerte del alga. Por tanto, es necesario determinar experimentalmente la relación de medio Zarrouk a utilizar en un medio de cultivo para un alga determinada, como se ha realizado en este trabajo de investigación para la *M. aeruginosa*.

Los resultados de la Tabla II, indican que una escasa utilización de nutrientes (soluciones de 3.6% y 14.6% v/v) no es suficiente para estimular el crecimiento de la *Microcystis aeruginosa*. No obstante, la prueba con 29.2% de medio de cultivo y con una razón de 0.1 ml de medio puro sobre ml de cultivo, logra producir el crecimiento exitoso.

Con el objetivo de conocer el volumen necesario de medio Zarrouk modificado (sin bicarbonato) para llevar a cabo el cultivo de la *Microcystis aeruginosa* en el fotobiorreactor a escala de laboratorio diseñado en este trabajo de investigación se utiliza la Ec. 3.

$$VMC = RMC * VC \quad (3)$$

VMC: Volumen de medio puro de cultivo (ml)
RMC: Razón de medio de cultivo (ml de medio de cultivo puro/ml de cultivo)
VC: Volumen de cultivo (ml)

Utilizando la razón de medio de cultivo de 0.1 (mayor crecimiento) y debido a que el volumen de cultivo en el fotobiorreactor fue de 8000 ml, se obtiene a través de la Ec. 2, que el volumen requerido de medio puro de la solución madre para el cultivo de la *Microcystis aeruginosa* es de 800 ml.

TABLA II
RAZONES DE MEDIO DE CULTIVO DE LOS DIFERENTES EXPERIMENTOS

Solución de Medio Zarrouk modificado (sin bicarbonato)	Razón de medio de cultivo (ml de medio puro/ml de cultivo)
Aforo con medio al 3.6% v/v	0.01
Aforo con medio al 14.6% v/v	0.05
Aforo con medio al 29.2% v/v	0.10

Mientras se utilice un exceso de medio de cultivo puro para el cultivo del alga, esta tiende a detener su crecimiento y produce la muerte celular antes de 12 horas. Es necesario nuevamente señalar que, en la bibliografía internacional se menciona cómo preparar el medio de cultivo (mezcla de nutrientes) pero no se indica qué concentración se debe utilizar para un resultado favorable en un alga específica, por este motivo, ha sido de suma importancia determinar la concentración de solución del medio y el volumen de medio puro necesario para el cultivo presentado en este trabajo.

2) *Perfiles de agua del Embalse del Cerrón Grande, agua de red con pretratamiento y agua de cultivo en el FBR*

Con el objetivo de obtener el perfil de agua del Cerrón Grande, se realizaron diversos análisis fisicoquímicos a una muestra de agua del Embalse y así se determinó la concentración y tipo de sales diluidas existentes en el hábitat de la *Microcystis aeruginosa*.

De igual forma, se realizaron pruebas fisicoquímicas al agua de red con pretratamiento, utilizada para el cultivo dentro del fotobiorreactor (FBR). Los pre-tratamientos de dicha agua son los siguientes: filtro contra sedimentos, filtro CBC de carbón activado y lámpara de luz ultravioleta. Cabe destacar que, el equipo mencionado se basa en ultrafiltración más esterilización por luz ultravioleta.

Una vez obtenida la mezcla de agua pre-tratada con las sales de medio de cultivo Zarrouk modificado, se le realizaron los análisis fisicoquímicos antes mencionados con la finalidad de comparar el perfil de agua del Embalse (hábitat natural del alga) con el del agua de medio de cultivo en el FBR. Los perfiles de agua obtenidos son expuestos en la tabla III.



TABLA III
TABLA COMPARATIVA PARA LOS PERFILES DE
AGUA DEL CERRÓN GRANDE, AGUA DE LA RED CON
PRETRATAMIENTO Y MEDIO DE CULTIVO EN EL FBR

Parámetro físicoquímico	Perfil de agua del Cerrón Grande	Perfil del agua de la red con pretratamiento	Perfil del medio de cultivo en el FBR
pH	6.9	7.0	6.9
Total, sólidos disueltos (ppm)	162.0	167.0	450.0
Alcalinidad parcial CaCO ₃ (ppm)	0.0	0.0	0.0
Alcalinidad total CaCO ₃ (ppm)	80.0	100.0	80.0
Dureza total CaCO ₃ (ppm)	80.0	100.0	80.0
Cloruros Cl ⁻ (ppm)	50.0	50.0	170.0
Fosfatos PO ₄ ³⁻ (ppm)	5.0	2.0	60.0
Sílice SiO ₂ (ppm)	20.0	15.0	15.0
Hierro Fe ²⁺ (ppm)	0.1	0.0	2.0
Nitratos NO ₃ ⁻ (ppm)	-	-	120.0
Cloro Cl ₂ (ppm)	0.0	0.0	0.0

Según los resultados expresados en la tabla III el agua del Embalse del Cerrón Grande presenta condiciones favorables para el crecimiento de alga, puesto que, contiene 50 ppm de cloruros y 5.0 ppm de orto fosfato libre que son nutrientes esenciales para su crecimiento. Por otro lado, el agua con pre-tratamiento utilizada para el cultivo, no contiene cloro libre, por lo que es un agua factible para el crecimiento del alga. Finalmente, el medio de cultivo en el FBR presenta condiciones favorables para el crecimiento de *M. aeruginosa* debido a que, el agua se ha enriquecido con nutrientes favorables para su crecimiento, aumentando la concentración orto fosfato libre, nitratos y cloruros con respecto al agua del Embalse del Cerrón Grande.

3) *Parámetros y condiciones monitoreados durante el cultivo*

Las condiciones de operación determinadas en este trabajo para el crecimiento de la *Microcystis aeruginosa*, en un fotobiorreactor vertical a escala de laboratorio son: pH entre 6.7 – 9.6, iluminancia entre 1927 – 6620 Lux, temperatura entre 26.1 – 33.5 °C y concentración de dióxido de carbono inyectado entre 10 – 16 %v/v, con un tiempo promedio de inyección de 5.2 minutos.

Se logra apreciar un aumento gradual en el comportamiento del pH, esto es debido a que por el crecimiento del alga se da un aumento de productos metabólicos que también hacen variar el medio, además por la acumulación de minerales y la oxidación de nutrimento [17]. El incremento en el pH es evidencia que la etapa de crecimiento de la *Microcystis aeruginosa* ya está finalizando.

La temperatura durante la experimentación presenta una variación bastante considerable de aproximadamente ± 3.7 °C, lo cual también puede afectar el crecimiento del alga debido a la disminución en la solubilidad del CO₂ (fuente de carbono) con el incremento de la temperatura, variación en las propiedades físicas del medio de cultivo y en las mismas funciones metabólicas del microorganismo. La temperatura óptima para el crecimiento del alga es de 25 ± 2 °C [17] y aproximadamente el rango mencionado de valores se encuentran en ese rango, motivo por el cual se puede inferir que en la mayor parte del periodo experimental el alga se encontró dentro de un rango de temperatura aceptable pero no óptimo en su totalidad, debido a que no se contó con un sistema de disipación de calor adecuado.

4) *Análisis de crecimiento de la Microcystis aeruginosa dentro del fotobiorreactor (FBR)*

Para analizar el desarrollo de *Microcystis aeruginosa* durante el cultivo dentro del FBR, se determinó el peso seco de alga contenida en las muestras recolectadas durante el período que duró el cultivo. En la Fig. 5, se grafican las concentraciones obtenidas. Las fechas de cultivo se encuentran en el periodo del 20 de julio al viernes 26 de julio de 2019.

GRÁFICO DE CONCENTRACIÓN VS HORAS TRANSCURRIDAS

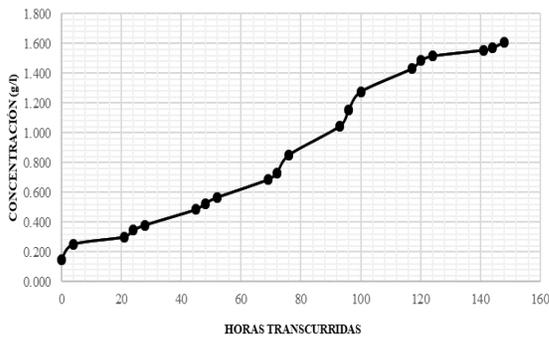


Fig. 5. Gráfico de concentración (g/l) vs horas.

A partir de la Fig. 5, se observa un crecimiento del alga en una proporción de 10.6 veces, al final de los 7 días de cultivo. Esto indica que las condiciones de cultivo propuestas en este trabajo y la concentración de los nutrientes suministrada son favorables para el cultivo de la *Microcystis aeruginosa*.

Partiendo de los datos observados en la Fig. 5, se puede determinar que a partir de las 120 horas de iniciado el cultivo, el sexto día de cultivo, no se observa una tendencia clara de crecimiento, es decir, pareciera que ha alcanzado un equilibrio en la tasa de crecimiento y de mortalidad del alga. Esto se debe a que el alga presenta una etapa avanzada de vida y la acumulación de metabolitos generados por el alga durante su crecimiento afectan el pH del medio de cultivo. Además, a medida que la concentración algal aumenta, el medio se vuelve más denso y penetra menos luz al interior del fotobiorreactor limitando el proceso fotosintético.

En la Fig. 6 se muestra la tasa de crecimiento del alga durante el período de cultivo. En el periodo inicial de 1 a 3 días se observa que la masa algal tiene una pequeña pendiente negativa en la tasa de crecimiento debido probablemente a un periodo de adaptación del microorganismo a las condiciones del cultivo (nutrientes, temperatura, agitación, difusión de gases). Sin embargo, al final del segundo día se observa una recuperación en la tasa de crecimiento, posterior al tercer día de cultivo se muestra un crecimiento exponencial, alcanzando al quinto día de cultivo el mayor crecimiento de alga (0.23 g/l•día). Finalmente, posterior al quinto día se observa un decrecimiento con una tasa de mortalidad del alga superior a la del crecimiento en la etapa anterior, posiblemente debido a la edad del alga, acumulación de metabolitos y la ausencia de un sistema de purgado de alga. El crecimiento diario y el aumento de la densidad algal se logra visualizar en la Fig. 7.

GRÁFICO DE CRECIMIENTO ALGAL (g/l día) VS DÍA DE CULTIVO

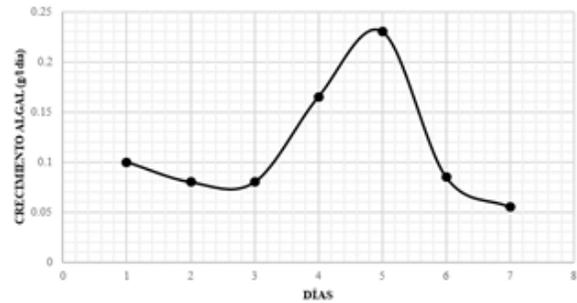


Fig. 6. Gráfico de crecimiento (g/l día)

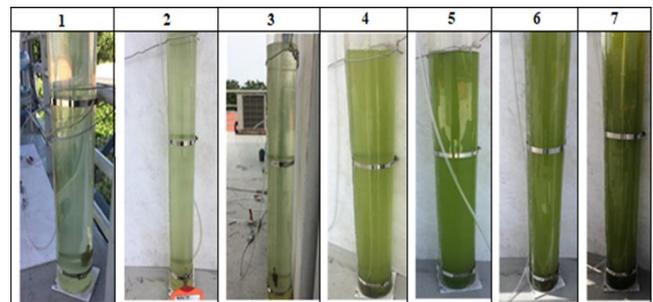


Fig. 7. Imágenes del crecimiento durante los días de cultivo.

Se evidencia a partir de las imágenes un aumento en la tonalidad verde del cultivo, y a su vez un crecimiento de algas. Sin embargo, a pesar del crecimiento de *Microcystis aeruginosa*, se observa la sedimentación de alga muerta en el fondo del fotobiorreactor (para el día 6) y presenta una tonalidad café.

Cabe destacar que, la *Microcystis aeruginosa* antes del cultivo en el fotobiorreactor presentaba una concentración celular de 300,034 células/ml y después del cultivo durante los 7 días se obtuvo una concentración celular de 2,949,780 células/ml. Por lo tanto, se logra demostrar que el crecimiento celular de la *Microcystis aeruginosa* dentro del fotobiorreactor ha sido efectivo, aumentando su crecimiento en un factor de 9.83 al finalizar el cultivo. Este factor de crecimiento es comparable y se encuentra en el mismo orden de magnitud que el obtenido por medio del análisis de peso seco (10.7).

Por otro lado, para tener un punto de comparación se dejó una muestra testigo de alga, en condiciones naturales (con la misma agua proveniente del Embalse del Cerrón Grande, para observar y analizar su crecimiento). Conocida la concentración a la que provenía la *Microcystis aeruginosa* del Embalse, de 0.22 g/l, y determinando su concentración luego de 5 días de dejarla en reposo y sin ningún nutriente o gas añadido (únicamente aireación), para replicar su condición de crecimiento; se obtuvo 1.5 g/l de alga. De la muestra testigo se calculó una proporción de crecimiento de



6.81, finalizados los 5 días. Comparándose con 5 días en las condiciones de cultivo en el fotobiorreactor, cuyas concentraciones inicial y final son 0.15 g/l y 1.275 g/l, respectivamente, se obtiene una proporción de 8.5. Determinándose así que, en condiciones debidamente controladas el crecimiento de alga puede potenciarse respecto a las condiciones naturales en las que se encuentra.

IV. CONCLUSIONES

Se evidenció el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en el fotobiorreactor diseñado en este trabajo, obteniéndose resultados más eficientes a los obtenidos en una muestra testigo de alga que se desarrolló en sus condiciones naturales. Después del mismo período de experimentación, se observó que la muestra testigo generó una tasa de crecimiento de 6.81 y para las condiciones controladas en el fotobiorreactor de 8.5. Asegurándose así, que el alga dentro del fotobiorreactor a escala de laboratorio a bajo las condiciones controladas logra un mayor rendimiento en su crecimiento que en su estado natural.

Según los resultados obtenidos, la geometría con mejor disolución de CO₂ en el fotobiorreactor es la de placa transversal, pues con un tiempo de 4 minutos se logró llegar a la saturación del medio. Sin embargo, la configuración mencionada genera un régimen de flujo de ascenso y descenso demasiado turbulento, provocando el rozamiento con las paredes del tubo y la placa, impidiendo el crecimiento algal en forma de colonias. Basándose en lo anterior, la configuración seleccionada para el cultivo es la de columna simple (sin geometría interior) a pesar de no ser la que presenta el menor tiempo de saturación de CO₂, permite un régimen de flujo apto para el reagrupamiento de las colonias de la *Microcystis aeruginosa*, evitando que sufra estrés por rozamiento y potenciando su desarrollo dentro del fotobiorreactor.

Las condiciones de operación determinadas en este trabajo para el crecimiento de la *Microcystis aeruginosa*, en un fotobiorreactor vertical a escala de laboratorio son: pH entre 6.7 – 9.6, iluminancia entre 1927 – 6620 Lux, temperatura entre 26.1 – 33.5 °C y concentración de dióxido de carbono inyectado entre 10 – 16 %v/v, con un tiempo promedio de inyección de 5.2 minutos y una proporción de 0.1 ml de medio Zarrouk modificado (sin bicarbonato) por cada ml de cultivo.

REFERENCIAS

- [1] A. I. d. C. p. e. Desarrollo, MARN and ISCOS, "Plan de Manejo Integral Participativo de los Recursos Naturales del Humedal Embalse Cerron Grande," Informe de consultoría, San Salvador, 2017.
- [2] D. Rubio, J. Sierra, S. Ruíz and J. Sandoval, "Diseño de un fotobiorreactor Airlift a escala banco," Revista elementos, pp. 124-141, 2014.
- [3] S. V. Vásquez and A. U. Brenes, "Diseño, Construcción y puesta en marcha de un Fotobiorreactor Tubular para producir la microalga Chlorella Sp.," Ciencia y Tecnología, pp. 28-49, 2015.
- [4] Rajasekaran, Chandrasekaran, "Effect of Modified Zarrouk's Medium on Growth of Different Spirulina Strains," Walailak Journal , vol. I, pp. 67-75, 2015.
- [5] R. Mahmoud, M. Ibrahim and G. Ali, "Closed photobioreactor for microalgae biomass production under indoor growth conditions," Journal of Algal Biomass Utilization, vol. I, pp. 86-92, 2016.