

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



REMOCIÓN FOTOSINTÉTICA DEL CO₂ PRESENTE EN EL BIOGÁS, UTILIZANDO UN FOTOBIORREACTOR INOCULADO CON *N. gaditana*, ACOPLADO A UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO GASEOSO.

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

RODRIGO ESTEBAN PÉREZ PÉREZ
TEMUCO-CHILE
Marzo 2013

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



REMOCIÓN FOTOSINTÉTICA DEL CO₂ PRESENTE EN EL BIOGÁS, UTILIZANDO UN FOTOBIORREACTOR INOCULADO CON *N. gaditana*, ACOPLADO A UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO GASEOSO.

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

RODRIGO ESTEBAN PÉREZ PÉREZ
PROFESOR GUÍA: DAVID ALEJANDRO JEISON NUÑEZ
TEMUCO-CHILE
Marzo 2012

**“REMOCIÓN FOTOSINTÉTICA DEL CO₂ PRESENTE EN EL BIOGÁS,
UTILIZANDO UN FOTOBIORREACTOR INOCULADO CON *N. gaditana*, ACOPLADO
A UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO GASEOSO”.**

PROFESOR GUÍA

: _____

DR. DAVID ALEJANDRO JEISON NUÑEZ
INGENIERO CIVIL EN BIOQUIMICA
DEPARTAMENTO INGENIERÍA QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE LAFRONTERA

PROFERORES GUIAS

: _____

DRA. LAUZA HAYDÉE AZOCAR ULLOA
INGENIERA AMBIENTAL
CENTRO BIOREN
DESERT BIOENERGY

CALIFICACION PROMEDIO TESIS : _____

Agradecimientos.

Quiero partir agradeciendo a mi profesor guía, David Jeison. Primero por aceptarme y darme la oportunidad trabajar con usted, también por ser un gran guía a lo largo de toda la tesis, por todo el apoyo que me brindo en mis proyectos personales y por sobre todo, por tenerme paciencia durante el periodo que trabaje bajo su tutela, se que fue difícil y por eso solo me queda darle mi más sincero agradecimiento.

Agradecer también a la Dra. Laura Azocar y al profesor Christian Vergara, por ser una guía fundamental en mi trabajo, por dedicar tiempo a mis dudas e inquietudes, por la destacable disposición y por los gratos momentos que compartimos.

De igual forma me dirijo a todas las personas con las que trabajé durante todo el 2012, a mis amigos y colegas del laboratorio 4, los cuales me recordaron que el trabajo en equipo es una de las herramientas más importantes a la hora de cumplir objetivos, y que siempre hay tiempo para apoyar a los amigos; por esto agradezco a: Javier, Álvaro, Hernán, Felipe, Freddy, Patricio, Catalina, Camilo, María y de manera especial a Leslie, por todo su apoyo, paciencia y ayuda. También agradecer a Gustavo, Fabiola, Rodrigo, Noelia, Pedro, don Alex y don Álvaro y en general a todas las personas que trabajan en Biorren, por hacer del lugar de trabajo un ambiente grato y entretenido.

Agradecer a mi directora de carrera Alejandra Sandoval, por todo el apoyo, los consejos y la buena disposición que me ha brindado durante en estos años de carrera.

Agradecer con todo el amor que tengo a mi familia, por su apoyo, por el amor que me han brindado y por los momentos felices que hemos pasado, agradezco a mis grandes hermanos, a mi cariñosa sobrina, a mis queridos abuelos, a mis afectuosos tíos y por sobre todo a mis amados padres, que se han sacrificado para darme la oportunidad de estudiar y poder llegar a esta instancia; sin ellos, ni su cariño, confianza y amor, nada de esto hubiese sido posible.

Por último y no menos importante, agradecer a mis queridos amigos, los del colegio, los del liceo y los universitarios, realmente me encantaría mencionarlos a todos, pero cada uno de ustedes saben que han ayudado aunque sea con un pequeño aliciente a esta agradecida persona, que aprecia su amistad a pesar que el tiempo o la distancia nos separen en muchas ocasiones, gracias por todo.

RESUMEN.

El biogás es un biocombustible producido a partir de la digestión anaerobia de materia orgánica, el cual está compuesto principalmente por CH_4 y CO_2 . Para mejorar la calidad de éste, y aumentar su poder calorífico, se debe implementar una etapa destinada a la remoción de su contenido de CO_2 . Como alternativa para la remoción del CO_2 existentes, se propone su captura fotosintética mediante microalgas en un fotobiorreactor.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad técnica de remoción de CO_2 desde biogás mediante el cultivo de microalgas en un fotobiorreactor acoplado a una columna de intercambio gaseoso.

Se observaron factores importantes para el proceso de una obtención de un gas con un menor porcentaje de CO_2 y O_2 , como la relación entre el volumen del fotobiorreactor con respecto al volumen de la columna de intercambio gaseoso, la velocidad de recirculación del líquido del reactor hacia la columna y la desorción de estos gases mediante el valor de K_{La} .

Finalmente, se pudo concluir que la remoción fotosintética de CO_2 puede ser una alternativa factible para aumentar el contenido de CH_4 en el biogás, posibilitando la generación de un biogás de mayor calidad. A pesar de esto se debe prestar importancia a la cantidad de CO_2 que se desorbe hacia el ambiente durante este proceso, siendo importante a futuro optimizar este proceso.

SUMMARY.

Biogas is a biofuel produced from the anaerobic digestion of organic matter, which is composed mainly of CH_4 and CO_2 . To improve the quality and increase its calorific value, it must implement a step aimed at removing CO_2 content. As an alternative to the CO_2 removal already described, it is proposed to capture photosynthetic microalgae in a photobioreactor.

The aim of this study was to evaluate the technical feasibility of CO_2 removal from biogas by growing microalgae in a photobioreactor coupled to a gas exchange column.

There were important factors in the process of obtaining a gas with a lower percentage of CO_2 and O_2 , as the ratio between the volume of the photobioreactor with respect to the volume of the gas-exchange column, the liquid recirculation rate to the reactor column and desorption of these gases through K_{La} value.

Finally, it was concluded that photosynthetic CO_2 removal can be a feasible alternative to increase the content of CH_4 in landfill gas, enabling the generation of a higher quality biogas, despite this importance should be given to the amount of CO_2 that desorbs into the atmosphere during this process and it is important to optimize this process future.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

<i>Capítulo</i>		<i>página</i>
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Hipótesis	3
1.2.	Objetivo General	3
1.3.	Objetivos Específicos	4
2.	MARCO TEÓRICO	5
2.1.	Producción de biogás mediante digestión anaerobia	5
2.2.	Importancia de la remoción de dióxido de carbono en el potencial calorífico del biogás	8
2.3.	Fijación Fotosintética del CO ₂	12
2.3.1.	Reacciones dependientes de luz	13
2.3.2.	Reacciones independientes de luz	15
2.4.	Limitantes del cultivo de microalgas	17
2.4.1.	Disponibilidad de la energía lumínica	17
2.4.1.1.	Región de foto-limitación	19
2.4.1.2.	Región de saturación	19
2.4.1.3.	Región de fotoinhibición	19
2.4.2.	El dióxido de carbono en el medio	21
2.4.3.	Generación de O ₂ mediante fotosíntesis	26
2.5.	Biocombustibles a partir de biomasa microalgal	27
2.5.1.	Biodiesel desde microalgas	28
2.5.2.	Biogás desde microalgas	29
3.	MATERIALES Y METODOS	31
3.1.	Microalga Modelo y Medio de Cultivo	31
3.2.	Configuración de los reactores	32
3.2.1	Biorreactor Anaerobio	32
3.2.2	Fotobiorreactor continuo acoplado a columna de intercambio de gases	33
3.3.	Operación de los Reactores	36

3.3.1	Producción de biogás del reactor anaerobio	36
3.3.2.	Factibilidad de la absorción de CO ₂ por la biomasa microalgal, en diferentes fases de recirculación	37
3.4.	Metodología analítica	39
3.4.1.	Crecimiento de la biomasa microalgal	39
3.4.2	Concentración de CO ₂ y de O ₂ disuelto purificado durante el tiempo de almacenaje	39
3.4.3.	Concentración de CH ₄ , CO ₂ y de O ₂ en la fase gaseosa	40
3.4.4	Cálculo de coeficiente de transferencia de masa gas-líquido	40
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	42
4.1.	Factibilidad de captura de CO ₂ a través de fotobiorreactor unido a columna de intercambio de gas	42
4.1.1	Operación fotobiorreactor	42
4.1.2	Análisis de la capacidad de captura fotosintética de CO ₂ desde biogás del sistema propuesto	46
5.	CONCLUSIONES	51
6.	REFERENCIAS	52

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<i>pagina</i>
1.1	Proyecto global para aprovechamiento de la biomasa Microalgal.	3
2.1	Esquema simplificado del proceso de digestión anaerobia.	6
2.2	Efecto de la concentración de metano sobre el índice de Wobbe y el poder calorífico.	9
2.3	Esquema que representa el proceso de fotosíntesis.	14
2.4	Esquema del ciclo de Calvin.	16
2.5	Efecto de la intensidad de luz sobre la velocidad de crecimiento específico de microalgas.	18
2.6	Diagrama de distribución de especies CO_2 (L), HCO_3^- y CO_3^{2-} en agua.	23
2.7	Esquema para transporte de carbono inorgánico en células de algas eucariotas vía transporte activo de CO_2 y HCO_3^- .	24
3.1	Esquema del reactor anaerobio utilizado para la producción de biogás.	32
3.2	Fotografía de fotobiorreactor conectado a columna de intercambio de gases.	34
3.3	Esquema fotobiorreactor conectado a columna de intercambio de gases.	35
3.4	Nomenclatura variables fotobiorreactor conectado a columna de intercambio de gases.	38
4.1	Monitoreo fotobiorreactor continuo acoplado a columna de intercambio de gases.	42
4.2	Monitoreo del flujo de gas de alimentación y pH del fotobiorreactor continuo acoplado a columna de intercambio de gases.	44

4.3	Concentración de CO ₂ y de O ₂ disuelto en la fase líquida fotobiorreactor acoplado a columna.	45
4.4	Balance de masa del CO ₂ y O ₂ con Fi=7,5 L d ⁻¹ , para de la primera fase experimental	48
4.5	Balance global del carbono en fotobiorreactor acoplado a columna, para la primera fase experimental.	49
4.6	Balance de masa del CO ₂ y O ₂ con Fi=10 L d ⁻¹ , para la segunda fase experimental	50
4.7	Balance global de carbono en fotobiorreactor acoplado a columna, para la segunda fase experimental.	51

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla</i>		<i>pagina</i>
2.1	Normativas para uso del biogás como combustible vehicular y/o para su inyección en la red de gas domiciliaria.	10
2.2	Descripción de los métodos tradicionales para la remoción de dióxido de carbono desde biogás.	11
2.3	Reacciones que participan en la fotosíntesis.	13
2.4	Reacciones de equilibrio del ácido carbónico.	22
2.5	Productividad de diferentes especies de microalga frente a atmósferas con alto contenido de CO ₂ .	26
2.6	Rendimientos de aceite para distintos cultivos.	28
2.7	Potencial metanogénico para biomasa microalgal.	29
3.1	Medio de cultivo f/2 enriquecido con N y P.	31
3.2	Balances de CO ₂ y O ₂ en fotobiorreactor unido a columna de intercambio de gases.	39
3.3	Método de cálculo de las formas de carbono inorgánico disuelto.	40

1. INTRODUCCIÓN

Es factible pensar que los combustibles de origen fósiles aun se mantengan vigentes por un largo periodo de tiempo, esto considerando el progreso de las tecnologías actuales, las potenciales reservas y a su vez la explotación de nuevas reservas no convencionales (por ejemplo: reservas de gas natural). Aun así, son evidentes en la actualidad las consecuencias que han producido el uso de estos combustibles fósiles en el aumento de los gases de efecto invernadero, favoreciendo de esta manera el cambio climático sobre los sistemas naturales y humanos. Este problema ha inspirado la búsqueda de alternativas energéticas limpias y renovables. Aunque existen varias potenciales fuentes de energía renovable, los biocombustibles han concentrado un mayor interés y se espera que desempeñen un papel crucial en la infraestructura global de energía en el futuro (Chen *et al.*, 2011).

La bioenergía destaca por su reducida o nula emisión de gases con efecto invernadero, ya que el carbono que se libera durante su uso fue capturado en su elaboración (Schubert y Blasch, 2010). Además, permite diversificar las fuentes de combustibles, entregando más seguridad al suministro, promueve desarrollo en zonas rurales y pueden ser usados en los motores actuales con pocas o nulas modificaciones (Mata *et al.*, 2010). Un tipo de bioenergía que ha despertado mucho interés es el biogás, el cual es producido a partir de digestión anaerobia de materia orgánica.

El biogás está compuesto principalmente por metano y dióxido de carbono, con sulfuro de hidrógeno y amoníaco en menor cantidad, siendo su contenido de metano lo que le confiere las características de biocombustible (Ryckebosch *et al.*, 2011). Mayoritariamente, el biogás puede ser utilizado para la producción de calor y electricidad a través de calderas y motores de combustión interna que no requieren el suministro de un biogás con alta concentración de metano. Sin embargo, existen otros usos interesantes, como su inyección en la red domiciliaria de gas natural y su uso como combustible vehicular, que requieren la utilización de biogás con mayor poder calorífico (Wellinger y Lindberg, 2005; Persson *et al.*, 2006; Rasi, 2009).

Para aumentar la calidad del biogás y obtener un mayor poder calorífico, se debe remover el contenido de dióxido de carbono, de tal manera de obtener un gas con un mayor porcentaje de metano (Persson *et al.*, 2006).

Una alternativa para la remoción de dióxido de carbono desde el biogás, es su captura mediante cultivos de microalgas. Estos microorganismos fotosintéticos se destacan por sus altas tasas de crecimiento y por su capacidad para crecer en un amplio rango de condiciones ambientales, lo cual incluye aguas residuales y agua salada. Además, pueden ser cultivados en fotobiorreactores que no requieren el uso de suelo fértil (Mata *et al.*, 2010; Hulatt y Thomas, 2011). Las microalgas, gracias a su capacidad fotosintética, pueden capturar el dióxido de carbono presente en el biogás, utilizándolo para la síntesis de biomoléculas, en presencia de luz solar (Conde *et al.*, 1993; Travieso *et al.*, 1993; Mann *et al.*, 2009; Kao *et al.*, 2012).

La purificación de biogás mediante microalgas puede enmarcarse en un proyecto global, que considere la producción de biocombustibles y el tratamiento de aguas residuales, tal como se describe en la Figura 1.1. La biomasa microalgal puede ser utilizada como materia prima para la producción de biodiesel, debido a su capacidad para acumular altas concentraciones de lípidos en sus células (Chisti, 2007). Posteriormente, la biomasa agotada (sin lípidos) puede ser utilizada para la producción de biogás mediante digestión anaerobia (Sialve *et al.*, 2009). Otra alternativa, es la utilización directa de la biomasa microalgal completa (sin extracción de lípidos) para la producción de biogás (Sialve *et al.*, 2009; Brennan y Owende, 2010; Zamalloa *et al.*, 2011). En ambas alternativas, el biogás puede ser recirculado al cultivo de microalgas para su purificación. A su vez, debido a que las microalgas utilizan nitrógeno y fósforo como nutrientes, pueden ser utilizadas en el tratamiento de aguas residuales (Wang *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2012).

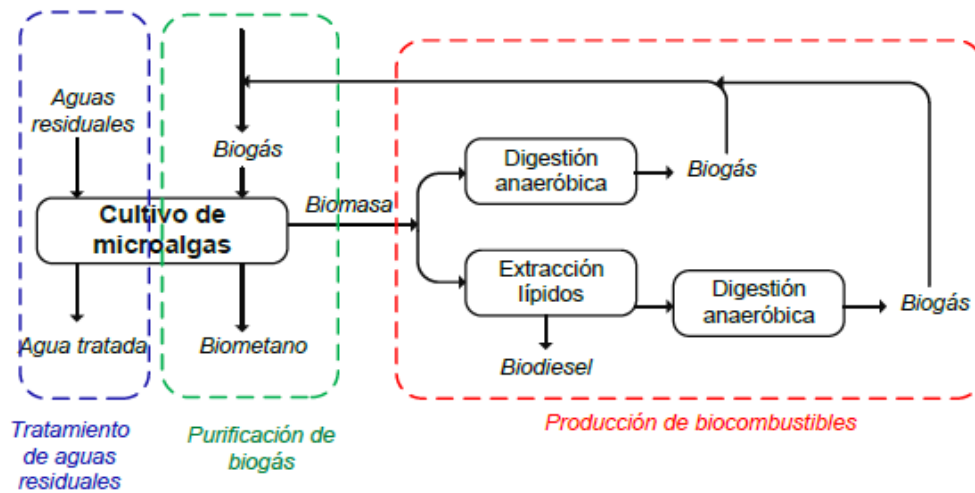


Figura 1.1: Proyecto global para aprovechamiento de la biomasa microalgal

Para estudiar la factibilidad técnica del proceso de remoción fotosintética de CO_2 , se debe estudiar el comportamiento de la biomasa microalgal frente a los principales componentes presentes en el biogás, estimando los rendimientos y eficiencias de remoción, de tal manera de evaluar su desempeño en un fotobiorreactor.

1.1. Hipótesis de Trabajo.

Dada la capacidad de fijación de dióxido de carbono que los microorganismos fotosintéticos poseen, es posible reducir las concentraciones de dióxido de carbono presente en el biogás obtenido de reactores anaerobios, incrementando la concentración del metano presente, mejorando la calidad del mismo.

1.2. Objetivo General.

Evaluar la efectividad técnica de remoción de dióxido de carbono desde biogás por medio de la operación de un fotobiorreactor inoculado con la microalga *Nannochloropsis gadinata*.

1.3. Objetivos Específicos.

- Generar un sistema de mejoramiento del potencial calorífico del biogás, mediante el uso de un reactor anaerobio conectado en línea a un fotobiorreactor acoplado a una columna de intercambio.
- Evaluar la capacidad de remoción de dióxido de carbono desde el biogás por medio de microalgas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Producción de biogás mediante digestión anaerobia.

La digestión anaerobia es un mecanismo de conversión de materia orgánica a metano y dióxido de carbono mediante una serie de transformaciones bioquímicas realizadas por un conjunto de microorganismos. En la naturaleza este mecanismo es muy común y ocurre tanto en pantanos, lagos, sedimentos marinos profundos como en órganos digestivos de insectos y rumiantes.

El proceso de degradación anaerobia de la materia orgánica involucra una serie de pasos intermediarios, los que son ejecutados por diversos tipos de microorganismos (Figura 2.1). Este proceso puede ser subdividido en cuatro etapas (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991):

- a) Hidrólisis:** Etapa en la cual las enzimas excretadas por bacterias fermentativas (exoenzimas) convierten materia compleja y no disuelta en componentes disponibles para su degradación, los cuales ahora son capaces de atravesar las paredes celulares y las membranas de las bacterias fermentativas.
- b) Acidogénesis:** En esta fase los compuestos disueltos presentes en células de bacterias fermentativas son convertidas a un número de compuestos simples, los cuales son entonces excretados. Dentro de estos compuestos se encuentran ácidos grasos volátiles (AGV), alcoholes, ácido láctico, CO_2 , H_2 , NH_3 y H_2S .
- c) Acetogénesis:** Es aquí donde los productos de la acidogénesis son convertidos a acetato, H_2 y CO_2 .
- d) Metanogénesis:** Etapa donde acetato, H_2 y CO_2 , formato o metanol son convertidos a metano (CH_4) y CO_2 .

Cada una de estas etapas es efectuada por grupos de microorganismos diferentes, por lo que se genera una interrelación estrecha entre ellos, dada por la transferencia de los compuestos intermediarios, productos para unos y a la vez sustratos para otros (Soubes, 1994). Prueba de esto es la dependencia entre bacterias

acetogénicas formadoras de hidrógeno y las bacterias metanogénicas consumidoras de hidrógeno. Debido a la presencia de estas últimas, las concentraciones de hidrógeno se mantienen en rangos bajos, lo cual permite que la conversión de etanol, butirato y propionato a acetato se favorezca.

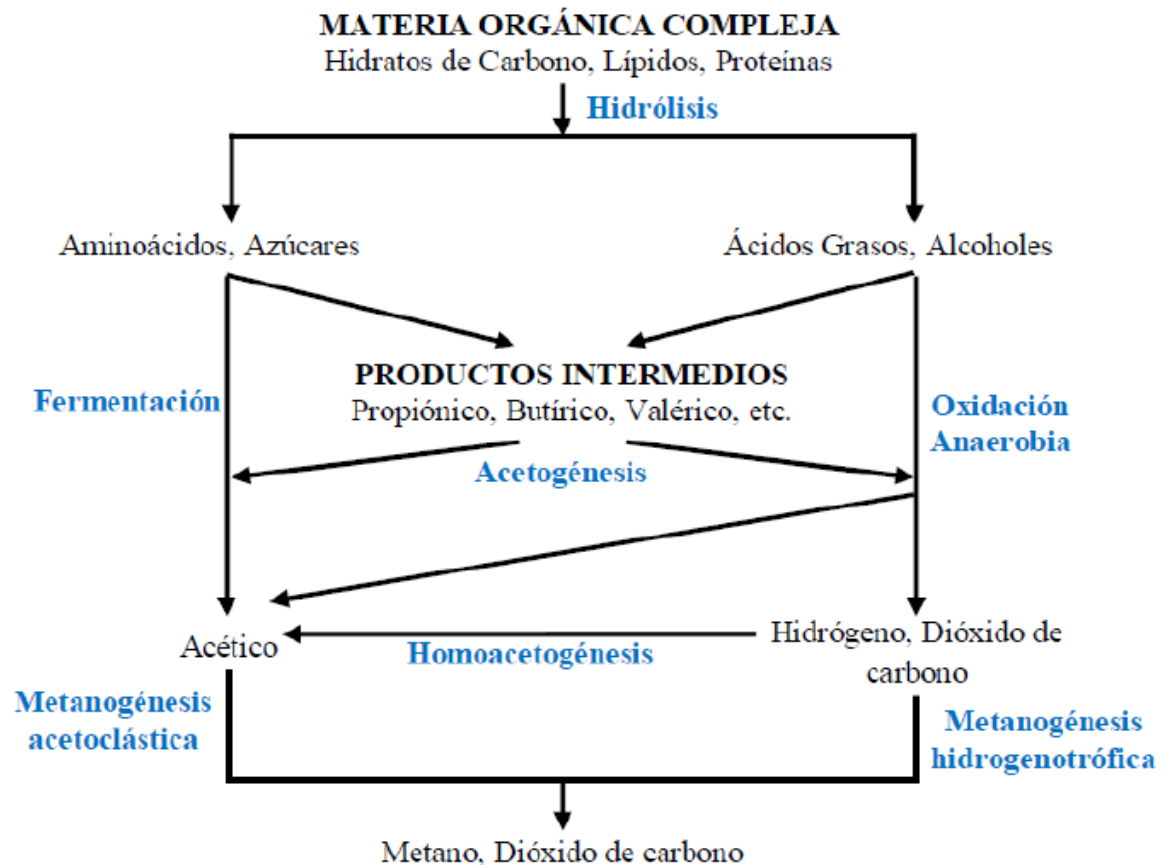


Figura 2.1: Esquema simplificado del proceso de digestión anaerobia (Pavlostathis y Giraldo- Gómez, 1991).

El tratamiento anaerobio de residuos líquidos representa una alternativa altamente confiable, ya consolidada, y ocupa hoy parte importante del mercado de depuración de aguas residuales. Entre las ventajas principales del tratamiento anaerobio, destacan:

- Bajos costos de capital y operación.

- Producción de energía: Biogás.
- Operación a altas velocidades de carga orgánica, lo que se traduce en requerimientos de espacio menores.
- El volumen de lodos producidos es menor en comparación a su contraparte aeróbica.
- La población bacteriana anaeróbica puede ser preservada por largos periodos de tiempo (incluso varios meses) sin una pérdida importante de su actividad.

La amplia investigación y desarrollo que ha caracterizado al tratamiento anaerobio las últimas dos décadas ha dejado atrás los inconvenientes que en sus inicios se podían esperar, tales como largos periodos de puesta en marcha, malos olores y problemas de operación debido a falta de conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso de conversión.

Los principales problemas y limitaciones de la digestión anaerobia se encuentran en la baja velocidad de crecimiento y metabolismo de las bacterias involucradas, la cual es altamente dependiente de la temperatura y que resulta en tiempos de retención elevados para el sustrato, y en la complejidad y sensibilidad del proceso a ciertas condiciones ambientales (por ejemplo, las bacterias metanogénicas son altamente sensibles a bajos valores de pH, por lo que la alcalinidad del reactor se vuelve un factor determinante). La existencia de inhibidores tales como el NH_3 también presenta un problema dependiendo de la naturaleza y origen del sustrato.

El biogás es el producto de la digestión anaerobia por medio de microorganismos de materia orgánica comprendida en diferentes sustratos como residuos agrícolas, residuos domiciliarios, lodos, aguas residuales industriales o domiciliarias, entre otros. Este es un proceso biológico complejo que ocurre en ausencia de oxígeno y en el cual participan cuatro grupos bacterianos de manera sintrófica: microorganismos hidrolíticos, acetogénicos, acidogénicos y metanogénicos.

El biogás es una mezcla de diferentes gases, siendo el metano y dióxido de carbono los más abundantes, en cantidades de 55-75% y 25-45% respectivamente, encontrándose a su vez sulfuro de hidrógeno (1000-3000 ppm) y amoníaco (<100 ppm) en cantidades menores (Singh y Gu, 2010; Harun *et al.*, 2011). El biogás es una interesante alternativa energética, ya que da solución a dos problemas ambientales, ya que es una fuente de energía renovable y da utilidad al creciente número de residuos orgánicos generados a diario.

El biogás tiene innumerables ventajas frente a los otros tipos de energías renovables, entre ellas se destaca que es un biocombustible versátil debido a que su producción es independiente de la época del año y del lugar geográfico, ya que no depende de las condiciones climáticas. Además, no requiere infraestructura compleja y costosa como otras energías renovables.

2.2 Importancia de la remoción de dióxido de carbono en el potencial calorífico del biogás

La remoción del contenido de CO₂ desde el biogás, es fundamental para alcanzar un gas de alta calidad, ya que a mayor concentración de este se reducen cualidades como el límite de inflamabilidad, velocidad de la flama y el poder calorífico (James, *et al.*, 1988), al remover el CO₂ de la mezcla se logra aumentar la concentración de metano en la mezcla, otorgando los siguientes beneficios:

- Aumento del poder calorífico del biogás y uso como alternativa al gas natural:
Podría usarse el biogás como combustible vehicular utilizando los motores diseñados para gas natural. Un mayor poder calorífico permite conducir mayores distancias con un determinado volumen de gas almacenado. Además, permite tener una calidad de gas constante que garantiza un manejo seguro (Wellinger y Lindberg, 2005). Junto al aumento de poder calorífico, la remoción del contenido de CO₂, disminuye la densidad relativa del biogás,

aumentando el índice de Wobbe. Este último parámetro establece la calidad del gas que puede ser inyectado a la red de gas domiciliar. Mientras más alto es su valor, mejor es la calidad del gas, el cual debe mantenerse dentro de un cierto rango establecido en la normativa (Persson *et al.*, 2006). El efecto del aumento de la concentración de metano en el gas sobre el índice de Wobbe se muestra en la Figura 2.2.

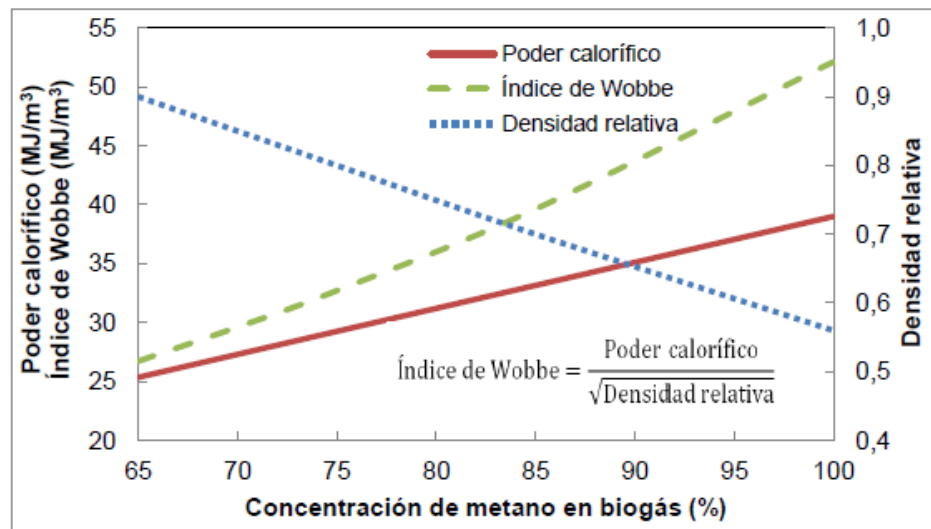


Figura 2.2: Efecto de la concentración de metano sobre el índice de Wobbe y el poder calorífico.

- Mayor eficiencia en el almacenamiento y manejo del biogás: No eliminar el CO₂ representa la pérdida de espacio físico de almacenamiento y un gasto energético adicional en el bombeo de esta mezcla. Además, en algunos casos, la compresión del gas puede producir ácido carbónico que puede deteriorar las instalaciones de almacenaje y de utilización (Herringshaw, 2009; Kao *et al.*, 2012).
- Menor cantidad de emisiones al medio ambiente: La remoción de CO₂ desde biogás, disminuye las emisiones de monóxido de carbono e hidrocarburos en la combustión del gas (Lastella *et al.*, 2002; Kao *et al.*, 2012). Además, si el

CO₂ es capturado antes, se evita su emanación a la atmósfera durante la combustión.

Existen normativas europeas que regulan la calidad del biogás, las cuales son bastante exigentes en relación a los límites de CO₂ y de O₂ presentes en éste. Dichas normativas se detallan en la Tabla 2.1. En Chile, la única normativa que regula el uso del biogás es la Norma Chilena NCh3213.Of2010, la cual indica las especificaciones mínimas que debe cumplir el biometano en el transporte, distribución y suministro (INN, 2010).

Tabla 2.1: Normativas para uso del biogás como combustible vehicular y/o para su inyección en la red de gas domiciliaria (Persson et al., 2006; Huguen y Le Saux, 2010; INN, 2010)

País	Suecia	Suiza	Alemania	Francia	Austria	Países Bajos	Chile ⁵
Contenido de CH ₄ (%)	95 - 99	> 96 ¹ > 50 ²	-	-	96	-	> 88
Poder calorífico superior (MJ/Nm ³)	-	38,5 - 47,2	30,2 - 47,2	38,52 - 46,08 ³ 34,20 - 37,80 ⁴	38,5 - 46	31,6 - 38,7	36,3 - 41,17
Índice de Wobbe (MJ/Nm ³)	43,9 - 47,3	47,9 - 56,5	46,1 - 56,5 ³ 37,8 - 46,8 ⁴	48,24 - 56,52 ³ 42,48 - 46,80 ⁴	47,7 - 56,5	43,46 - 44,41	47,28 - 52,72
CO ₂ (%)	< 4	< 6	< 6	< 2,5	< 3	< 6 < 10 (red regional)	1,5 - 4,5 ⁶
O ₂ (%)	< 1	< 0,5	< 0,5	< 0,01	< 0,5	< 0,5	< 1
H ₂ S (mg/Nm ³)	< 15,2	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	-
Azufre total (mg/Nm ³)	< 23	< 30	< 30	< 30	< 10	< 45	< 35 ⁷ < 65 ⁸
NH ₃ (mg/Nm ³)	< 20	< 20	-	< 3	-	< 3	-

¹ Estándar para inyección de gas ilimitada en Suiza. ² Estándar para inyección de gas limitada en Suiza. ³ Gas de alto poder calorífico. ⁴ Gas de bajo poder calorífico. ⁵ Requisitos de calidad que debe cumplir el biometano en Chile, según NCh 3213/2010. ⁶ Suma de dióxido de carbono y nitrógeno. ⁷ Antes de adición de odorante. ⁸ Después de adición de odorante.

Las tecnologías tradicionales utilizadas para la remoción de CO₂ desde biogás son: absorción en solventes, adsorción por cambio de presión, separación por

membranas y separación criogénica. En la Tabla 2.2, se señala una breve descripción de cada una de ellas.

Tabla 2.2: Descripción de los métodos tradicionales para la remoción de dióxido de carbono desde biogás (Kapdi et al., 2005; Persson et al., 2006; Hullu et al., 2008).

Método de purificación	Descripción	Pureza (% CH ₄)	Costo (€/Nm ³ biogás)
Absorción en solventes.	El CO ₂ se solubiliza en un flujo de agua o de un solvente orgánico, en contracorriente en una columna empacada.	98	0,17 (solventes químicos) 0,13 (agua)
Adsorción por cambio de presión.	El CO ₂ se adsorbe en columnas con carbón activado o con tamices moleculares, a elevada presión.	98	0,25
Separación por membranas	La separación se realiza gracias a la diferencia de tamaño de las moléculas, lo que se traduce en diferencias de permeabilidad a través de la membrana.	89,5	0,12
Separación criogénica	CO ₂ y CH ₄ poseen diferentes puntos de ebullición (CO ₂ : -78°C; CH ₄ : -160°C; a 1 atm). El biogás es comprimido y luego enfriado hasta que se llega a la temperatura a la cual condensa el CO ₂ , logrando ser separado del metano que aún continua en estado gaseoso.	91	0,44

La principal ventaja de los métodos tradicionales para el tratamiento de biogás frente a la posible fijación fotosintética de CO₂, son sus altas capacidades de remoción de CO₂, lo que les permite ser sistemas compactos que alcanzan altas purezas de metano (Hullu *et al.*, 2008). Sin embargo, involucran altos costos de inversión, son altamente demandantes de energía y muchas veces su operación es compleja. Muchos de estos métodos requieren previa remoción del sulfuro de hidrógeno y aquellos procesos que involucran líquidos, como la absorción, generan residuos que deben recibir un adecuado tratamiento antes de su disposición o su regeneración (Persson *et al.*, 2006).

En contraposición, las principales ventajas que posee la fijación biológica de CO₂ mediante microalgas, por sobre los métodos tradicionales son dos: evita la liberación de CO₂ al ambiente mediante la absorción biológica, permitiendo acceder al mercado de bonos de carbono, recibiendo financiamiento extra; por otro lado la remoción de CO₂ mediante microalgas puede insertarse en un proyecto global de

producción de biocombustibles y tratamiento de aguas residuales. En un proceso de tales características, se podrían usar los cultivos de microalgas existentes para promover la purificación del biogás, reduciendo los costos potenciales y proporcionando una fuente de carbono para el crecimiento de las microalgas.

2.3 Fijación Fotosintética del CO₂

El término microalgas es utilizado para referirse al conjunto de microorganismos fotosintéticos procariontes (cianobacterias) y eucariontes: *Rhodophyta* -algas rojas-, *Chlorophyta* -algas verdes-, *Dinophyta*, *Chrysophyta* -algas doradas-, *Prymnesiophyta*, *Bacillariophyta* –diatomea-, *Xanthophyta*, *Eustigmatophyta*, *Rhaphidophyta* y *Phaeophyta* -algas café-; (Richmond, 2004; Sialve *et al.*, 2009; Brennan y Owende, 2010). Estas están presentes en todos los ecosistemas de la Tierra, representando una gran variedad de especies que habitan en un amplio rango de condiciones ambientales. Se estima que existen más de 50 mil especies, de las cuales sólo se han estudiado 30 mil (Mata *et al.*, 2010).

Las microalgas son adecuadas para fijar CO₂ debido a que poseen altas velocidades de crecimiento y de captura de CO₂, en comparación a otros organismos fotosintéticos (fijan CO₂ con un eficiencia 10 a 50 veces mayor que las plantas terrestres). Su mayor eficiencia se debe principalmente a que no poseen estructuras no fotosintéticas, como tallos y raíces (Wang *et al.*, 2008; Packer, 2009). Pueden crecer en cualquier lugar donde hay suficiente luz y pueden ser cultivadas en tierras no fértiles e ineficientes para agricultura, por lo que no se compite con la producción de alimentos (Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010; Demirbas, 2011). Pueden crecer continuamente, evitando los ciclos de crecimiento y cosecha que caracteriza a las plantas (Packer, 2009).

Las microalgas realizan fotosíntesis oxigénica, mediante la cual liberan O₂ al medio ambiente (Madigan y Martinko, 2006). La fotosíntesis oxigénica es una reacción de óxido-reducción impulsada por energía lumínica, en la cual CO₂ y H₂O

son convertidos en carbohidratos y O₂ (Richmond, 2004). Los cloroplastos están constituidos por pigmentos fotosintéticos capaces de absorber luz en el rango de 400 a 700 nm (lo que se denomina radiación fotosintéticamente activa: PAR), siendo los principales pigmentos, clorofila tipo *a* y *b* y carotenoides (Barsanti y Gualtieri, 2006).

La fotosíntesis es un proceso que consiste en dos tipos de reacciones: reacciones dependientes de luz y reacciones independientes de luz. Ambas reacciones se describen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Reacciones que participan en la fotosíntesis (Reynolds, 2006).

Reacciones dependientes de luz	$2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{NADP} + 3 \text{ADP} + 3 \text{P} + \text{luz} \rightarrow 2 \text{NADPH} + 3 \text{ATP} + 2 \text{H}^+ + \text{O}_2$
Reacciones independientes de luz	$\text{CO}_2 + 3\text{ATP} + 2\text{NADPH} + 2\text{H}^+ \rightarrow \frac{1}{6}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{H}_2\text{O} + 3\text{ADP} + 3\text{P} + 2\text{NADP}$
Proceso global	$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{luz} \rightarrow \frac{1}{6}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + \text{O}_2$

2.3.1. Reacciones dependientes de luz:

En esta fase la energía lumínica es convertida a energía química. Ocurre en la membrana tilacoide del cloroplasto, en donde se encuentran dos complejos proteicos, denominados fotosistemas I (PS I) y II (PS II), junto a complejos de pigmentos antena. El complejo de pigmentos antena es el encargado de canalizar los fotones de luz hacia el centro de reacción de los fotosistemas. Los fotosistemas contienen en su centro de reacción clorofilas especializadas que participan en las reacciones de óxido-reducción (PS I: clorofila P700, máxima absorción: 700 nm; PSII: clorofila P680, máxima absorción: 680 nm) (Madigan y Martinko, 2006).

Cuando el PS II absorbe luz, la clorofila de su centro de reacción cambia a un estado excitado, lo que permite que pueda donar un electrón, produciéndose su oxidación. A su vez, los fotones de luz suministran la energía necesaria para escindir una molécula de agua, transfiriéndose los electrones de la molécula de agua al PS II

oxidado, volviendo de esta forma a su estado normal. Cuando el PS II dona un electrón comienza una cadena de transporte de electrones a través de una serie de intermediarios, en donde participa una molécula de feofitina, una plastoquinona, un complejo citocromo *b6 f* y una plastocianina, cada uno de los cuales actúa como aceptor y dador de electrones. Cuando el PS I absorbe luz, se excita y puede donar un electrón a una molécula de ferredoxina, para posteriormente producir la reducción de NADP⁺ a NADPH. Esta última molécula es un reductor bioquímico. El PS I queda oxidado pero se vuelve a reducir con la donación del electrón proveniente de la cadena de transporte de electrones por parte de la plastocianina (Campbell y Shawn, 2004; Richmond, 2004; Barsanti y Gualtieri, 2006; Madigan y Martinko, 2006). Un esquema general del proceso de fotosíntesis se muestra en la Figura 2.3.

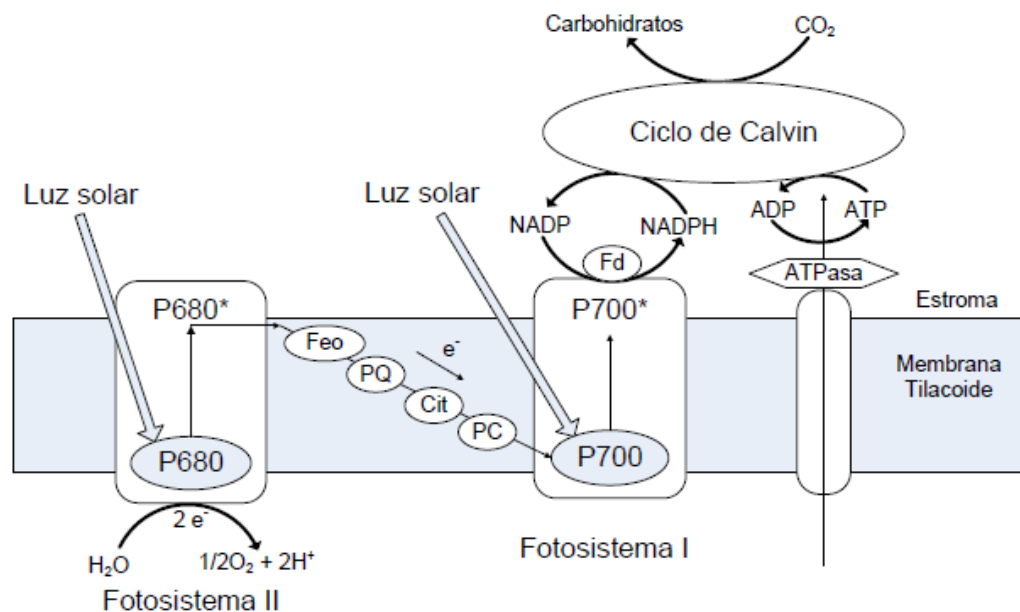


Figura 2.3: Esquema que representa el proceso de fotosíntesis. (Donde Feo: feofitina, PQ: plastoquinona, Cit: citocromo, PC: plastocianina, Fd: ferredoxina) (Richmond, 2004; Ho et al., 2011).

Las reacciones que se producen en la cadena de transporte de electrones generan un gradiente de protones a los lados de la membrana tilacoide, siendo el pH intratilacoide menor al pH del estroma. El flujo de protones desde el espacio

intratila coide hacia el estroma provoca la energía necesaria para la síntesis de ATP a través de la enzima ATP-sintetasa (Campbell y Shawn, 2004; Richmond, 2004).

2.3.2. Reacciones independientes de luz:

Se llevan a cabo en el estroma del cloroplasto y se les conoce como Ciclo de Calvin. Durante esta fase las moléculas de ATP representan la fuente de energía y el NADPH representa el poder reductor, ambos aspectos necesarios para la elaboración de biomoléculas mediante la fijación de CO_2 (Richmond, 2004; Madigan y Martinko, 2006). Las reacciones independientes de luz no ocurren en la oscuridad, más bien ocurren simultáneamente con las reacciones dependientes de luz, pero la luz no está directamente involucrada en esta fase, sino indirectamente, ya que la fase con luz entrega la energía suficiente para su realización (Barsanti y Gualtieri, 2006).

El Ciclo de Calvin consiste en la reducción de CO_2 a compuestos orgánicos mediante una serie de reacciones enzimáticas, en donde participa de forma crucial la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) (Figura 2.4).

La acción de la enzima Rubisco representa un paso clave en la fijación de CO_2 . La enzima Rubisco es bifuncional, es carboxilasa catalizando la reducción de ribulosa bisfosfato para la fijación de CO_2 en la fotosíntesis y es oxigenasa catalizando la oxidación de ribulosa bisfosfato en la fotorrespiración (Reynolds, 2006).

Esta enzima presenta dos desventajas. Por una parte, su baja velocidad de reacción en comparación a otras enzimas, catalizando aproximadamente tres moléculas por segundo comparada con la catálisis de mil moléculas por segundo de una enzima típica (Barsanti y Gualtieri, 2006). Por otra parte, debido a su bifuncionalidad, existen dos potenciales sustratos, el CO_2 y el O_2 , que compiten por su sitio activo. Dependiendo de las concentraciones de cada sustrato, la enzima preferirá a uno por sobre el otro. Cuando la enzima realiza su función de carboxilasa se produce la fotosíntesis y la reducción de CO_2 a compuestos biológicos, pero

cuando realiza su función de oxigenasa se produce la fotorrespiración, mediante la cual se consume O_2 y se libera CO_2 al ambiente. Este último proceso compite con la fotosíntesis y reduce la eficiencia de la captura de CO_2 desde el medio (Douglas *et al.*, 2003).

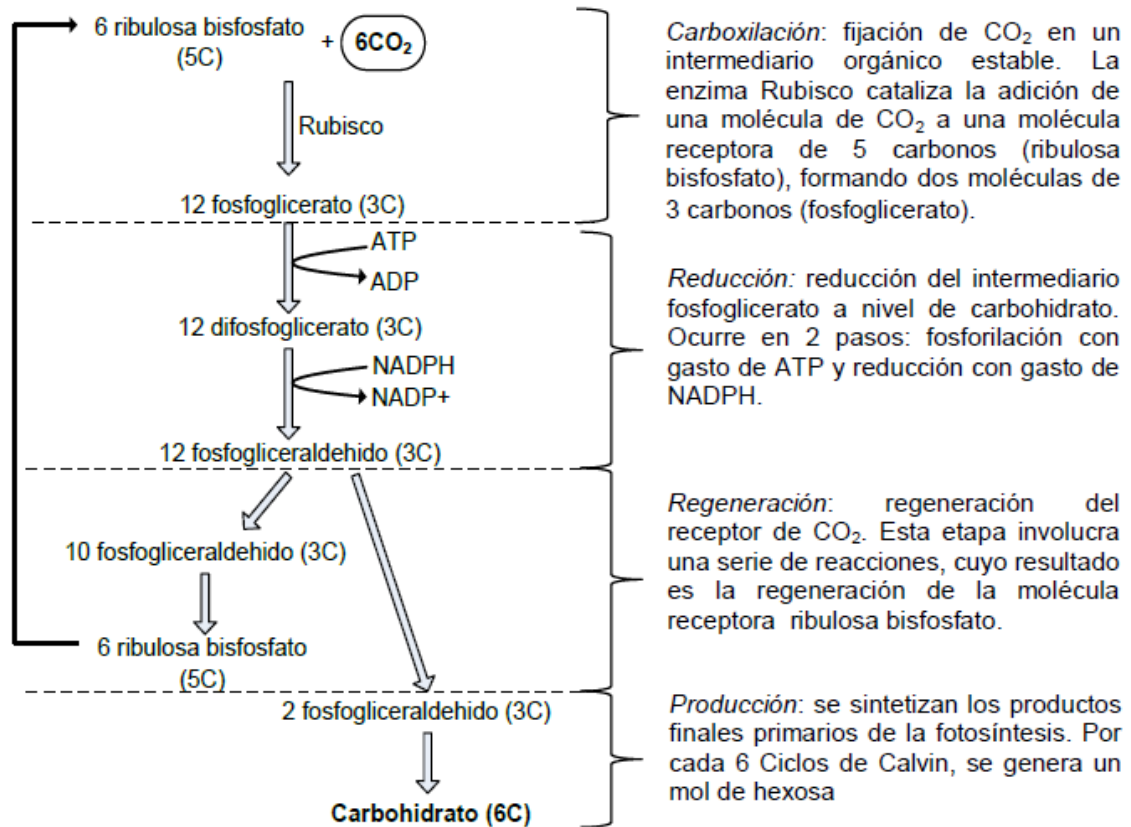


Figura 2.4: Esquema del ciclo de Calvin. (El esquema representa 6 Ciclos de Calvin, lo cual genera un mol de hexosa) (Richmond, 2004; Barsanti y Gualtieri, 2006; Madigan y Martinko, 2006).

Otro tema importante a considerar es la respiración que se lleva a cabo cuando los organismos fotosintéticos no reciben luz. La respiración genera pérdidas en la productividad de la biomasa microalgal durante la noche y en zonas afóticas durante el día (Grobbelaar y Soeder, 1985). Las microalgas al no recibir luz durante varias horas, deben obtener la energía necesaria para su metabolismo de otras fuentes de energía, realizando respiración, por lo cual se consume O_2 y se libera CO_2 . Durante

una noche se puede llegar a perder un 25% de la biomasa producida durante el día (Chisti, 2007). El grado de esta pérdida depende del nivel de luz en el cual las microalgas crecen, la temperatura de crecimiento, el tiempo en la oscuridad y la temperatura durante la noche (Grobbelaar y Soeder, 1985; Chisti, 2007).

2.4 Limitantes del cultivo Microalgal.

Los principales factores que pueden afectar la captura fotosintética de CO₂ desde biogás son: disponibilidad de energía lumínica, inhibición por altas concentraciones de CO₂ y generación de O₂.

2.4.1. Disponibilidad de energía lumínica:

La disponibilidad y la intensidad de luz es un factor esencial para la fotosíntesis y como consecuencia, para la captura de CO₂ en cultivos de microalgas.

De la intensidad de la radiación solar promedio que llega a la superficie de la Tierra en un día despejado (1000 W m⁻²), el 3% es radiación UV, un 55% es radiación infrarroja y sólo un 42% es luz visible y puede ser utilizado por los organismos fotosintéticos (400 W m⁻² o 1800 µmol m⁻² s⁻¹) (Richmond, 2004; Barsanti y Gualtieri, 2006).

La intensidad de luz que incide en la superficie del cultivo no es igual a la intensidad que reciben las células de microalgas. La intensidad de luz que llega a las células depende de la concentración y morfología de la biomasa microalgal, de las características de absorción de los pigmentos, de la trayectoria óptica del reactor, del grado de mezcla del medio de cultivo, de la longitud de onda de la luz y de la geometría del reactor (Molina Grima *et al.*, 1999; Richmond, 2004; Kumar *et al.*, 2011). A su vez, la intensidad de luz incidente depende de la hora del día, del día del año, de la latitud geográfica y de los factores meteorológicos (Molina Grima *et al.*, 1999).

La intensidad de luz promedio (I_p) que llega a las células se puede estimar mediante la ecuación 2.1. Esta ecuación es el resultado de la integración de la ley de Lambert Beer y representa el nivel de luz que recibe una célula que se mueve al azar por el interior del cultivo (Bagus, 2009):

$$I_p = \frac{I_0 (1 - e^{-a_c X z})}{a_c X z} \quad (2.1)$$

Donde I_0 es la intensidad de luz incidente, a_c es el coeficiente de absorción promedio de la biomasa, X es la concentración de biomasa y Z es la trayectoria óptica del reactor.

Como se observa en la Figura 2.5, es posible distinguir tres regiones que describen diferentes comportamiento de la biomasa microalgal frente a la intensidad de luz.

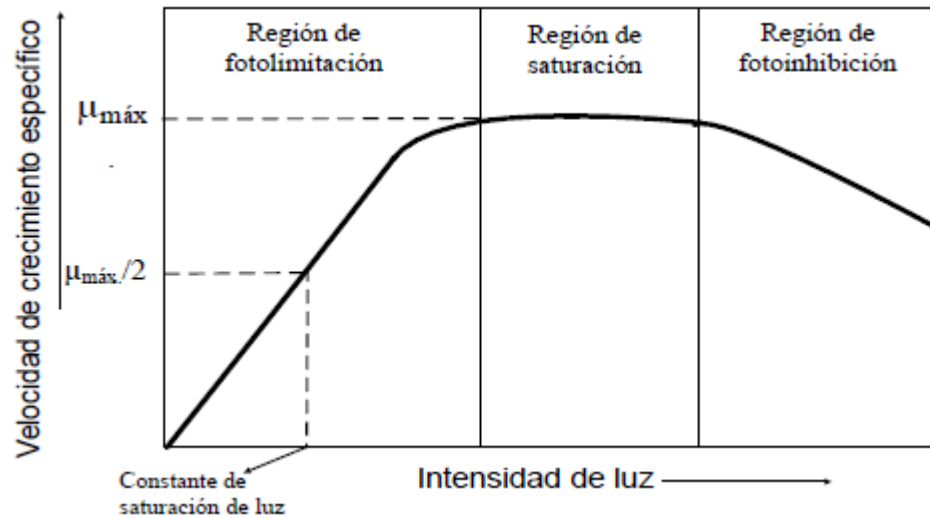


Figura 2.5: Efecto de la intensidad de luz sobre la velocidad de crecimiento específico de microalgas (Chisti, 2007).

2.4.1.1. Región de foto-limitación:

En bajas intensidades de luz, la velocidad de la fotosíntesis depende linealmente de la intensidad de luz (Richmond, 2004). La foto-limitación es frecuente en cultivos con una alta densidad microalgal, en donde las células se bloquean mutuamente la luz, formando un gradiente de luz a través del cultivo (Wang *et al.*, 2008). En algunos cultivos se ha estimado que la luz penetra sólo de 1 a 2 mm más allá de la superficie, de manera que la zona fótica representa sólo una pequeña fracción (10-30%) del volumen total del cultivo (Contreras *et al.*, 2003).

2.4.1.2. Región de saturación:

Al aumentar la intensidad de la luz, se llega a un valor máximo para la velocidad de la fotosíntesis y por lo tanto, para la velocidad de crecimiento. En este punto máximo, la fotosíntesis es independiente de la intensidad de luz (Richmond, 2004; Chisti, 2007; Grobbelaar, 2009; Posten, 2009). En intensidades de luz de saturación, la velocidad de la fotosíntesis generalmente está limitada por los procesos enzimáticos del Ciclo de Calvin (Richmond, 2004).

2.4.1.3. Región de fotoinhibición:

Una exposición prolongada a una intensidad de luz superior al valor óptimo produce el decaimiento de la velocidad de crecimiento de la biomasa (Richmond, 2004; Chisti, 2007; Grobbelaar, 2009; Posten, 2009). Las microalgas se caracterizan por tener constantes de saturación de luz bastantes menores a la máxima intensidad de luz que se puede conseguir a medio día (Chisti, 2007). Las constantes de saturación de encuentran en un rango aproximado entre 50 a 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Megard *et al.*, 1984; Kurano y Miyachi, 2005; Pruvost *et al.*, 2008; Bagus, 2009; Watson, 2009; Kumar *et al.*, 2011), lo cual corresponde a sólo 2 a 10% de la intensidad de luz incidente a pleno día (2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Chisti, 2007). Lo anterior, significa que aunque puedan obtener una gran cantidad de energía, no la pueden usar, dado que la velocidad de absorción de fotones por las moléculas de clorofila del complejo antena

exceden la velocidad máxima de la fotosíntesis, por lo que el exceso de fotones absorbidos son disipados como fluorescencia o calor, lo que provoca daños a los fotosistemas del cloroplasto (Melis *et al.*, 1998), especialmente en el fotosistema II (Richmond, 2004). También se ha reportado una relación entre temperatura y la intensidad de luz de saturación. Mientras más baja es la temperatura, menor es la intensidad de luz a la cual el cultivo se satura, y viceversa. Por lo tanto, bajas temperaturas y altas intensidades de luz pueden provocar disminución de la velocidad fotosintética (Richmond, 2004)

Sin embargo, los sistemas fotosintéticos han desarrollado mecanismos de aclimatación a bajas y altas intensidades de luz. En bajas intensidades de luz, los organismos aumentan su pigmentación (generalmente de clorofila *a*), ya sea aumentando el número de unidades fotosintéticas o el tamaño de los complejos de captación de luz, mejorando la eficiencia del proceso. En altas intensidades de luz, ocurre el proceso inverso. Usualmente, las células aclimatadas a altas intensidades de luz, poseen un alto contenido de carotenoides en relación al contenido de clorofila *a*. Los carotenoides protegen los centros de reacción de una excesiva excitación. Estos cambios de pigmentación ocurren en escala de días (Richmond, 2004).

En sistemas a gran escala, como serían aquellos destinados a un eventual proceso de remoción fotosintética de dióxido de carbono desde biogás, se deberá trabajar con fotoperíodos naturales, dado que no es económicamente factible tener iluminación constante mediante luz artificial, aunque esto trae ciertas dificultades técnicas. Las microalgas sin iluminación no tienen energía para realizar fotosíntesis, por lo que sólo pueden llevar a cabo respiración, liberando dióxido de carbono al medio (Granum y Mykkestad, 2002). Debido a que durante la noche, no se consume CO₂, sino que se libera, no sería posible operar un sistema de limpieza de biogás mediante microalgas de manera continua, durante las 24 horas del día. Por ejemplo, en un fotobiorreactor iluminado con luz natural y control de pH mediante el flujo de CO₂, utilizando la microalga *Phaeodactylum tricornutum*, la cantidad de CO₂ que pudo ser inyectado durante la noche (0,07 g min⁻¹), manteniendo pH constante, fue

considerablemente menor que la cantidad que pudo ser inyectada durante el día ($0,40 \text{ g min}^{-1}$) (Sobczuk *et al.*, 2000).

2.4.2. El dióxido de carbono en el medio:

El CO_2 es el nutriente más importante para el cultivo de microalgas. Alrededor del 45-50% del peso seco de la biomasa microalgal es carbono, por lo que se necesitan aproximadamente $1,65\text{-}1,85 \text{ g}$ de CO_2 por cada g de biomasa producida. Todo el carbono necesario para la célula proviene del CO_2 gaseoso, por lo que durante las horas de iluminación debería suministrarse continuamente para cubrir las necesidades fotosintéticas (Sobczuk *et al.*, 2000; Doucha *et al.*, 2005; Chisti, 2007). Para asegurar que las células de microalgas puedan asimilar la fuente de carbono, se debe mantener como mínimo una presión parcial de $0,1 - 0,2 \text{ kPa}$ en el fotobiorreactor, para evitar limitación por carbono (Posten, 2009).

Bajo condiciones naturales, las microalgas asimilan el CO_2 disuelto en equilibrio con el aire. Sin embargo, debido a la baja presión parcial de CO_2 presente en el aire ($0,00038 \text{ atm}$ o $0,04 \text{ kPa}$), las concentraciones de carbono disuelto son insuficientes para una óptima velocidad de crecimiento de la biomasa microalgal. Una baja razón CO_2/O_2 puede provocar que la enzima Rubisco actúe como oxigenasa, produciendo fotorrespiración (Richmond, 2004); por lo tanto, para lograr un mayor crecimiento de la microalga se usa la inyección de aire enriquecido con CO_2 (Packer, 2009), o se adiciona carbono al medio de cultivo en la forma de carbonatos solubles como Na_2CO_3 y NaHCO_3 (Brennan y Owende, 2010). Como alternativa, para reducir costos de operación, se inyectan gases residuales provenientes de combustión ($3\text{-}15\% \text{ CO}_2$) (Wang *et al.*, 2008; Packer, 2009; Sydney *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2011) y como se propone en este trabajo, también sería posible la utilización de biogás ($25\text{-}45\% \text{ CO}_2$).

No sólo es importante el suministro de CO_2 al medio de cultivo porque éste es el principal nutriente, sino que también porque es fundamental para el control del pH

del cultivo (Sobczuk *et al.*, 2000). De esta manera, el CO₂ debería suministrarse en una velocidad proporcional a la velocidad de fijación fotosintética de carbono (Eriksen, 2008).

El CO₂ en ambiente acuoso, existe en equilibrio con CO₂ (ac), H₂CO₃, HCO₃⁻ y CO₃⁻², cuya concentración depende del pH y de la temperatura (Stumm y Morgan, 1995; Manahan, 2007; Kumar *et al.*, 2011). Debido a que la concentración de CO₂ (ac) es más alta que la concentración de H₂CO₃ (en el orden de 103) (Mook, 2000; Manahan, 2007), se designará en este trabajo como CO₂ (L), a la suma de CO₂ (ac) + H₂CO₃. Las reacciones involucradas en el equilibrio químico junto a las constantes de solubilidad y acidez, se detallan en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4: Reacciones de equilibrio del ácido carbónico (Stumm y Morgan, 1995; Mook, 2000; Manahan, 2007).

Reacciones	Constantes	Valor constantes (25°C)	
		Agua dulce	Agua de mar
$\text{CO}_{2(g)} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_{2(ac)}$ $\text{CO}_{2(ac)} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$	$K_H = \frac{[\text{CO}_{2(L)}]}{p\text{CO}_2}$	3,428*10 ⁻² mol L ⁻¹	2,858*10 ⁻² mol L ⁻¹
$\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	$K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_{2(L)}]}$	4,498*10 ⁻⁷	14,52*10 ⁻⁷
$\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{-2} + \text{H}^+$	$K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{CO}_3^{-2}]}{[\text{HCO}_3^-]}$	0,479*10 ⁻¹⁰	11,12*10 ⁻¹⁰

El rango de pH en el cual la mayoría de los cultivos crecen se encuentra entre 7 y 9, con un rango óptimo entre 8,2 a 8,7 (Barsanti y Gualtieri, 2006). En este rango de pH, la mayor cantidad de carbono se encuentra en la forma de bicarbonato, siendo la fracción de CO₂(L) muy baja, tal como se muestra en la Figura 2.6; en esta imagen también puede observarse el efecto del pH sobre el sistema CO₂ (L), HCO₃⁻ y CO₃⁻².

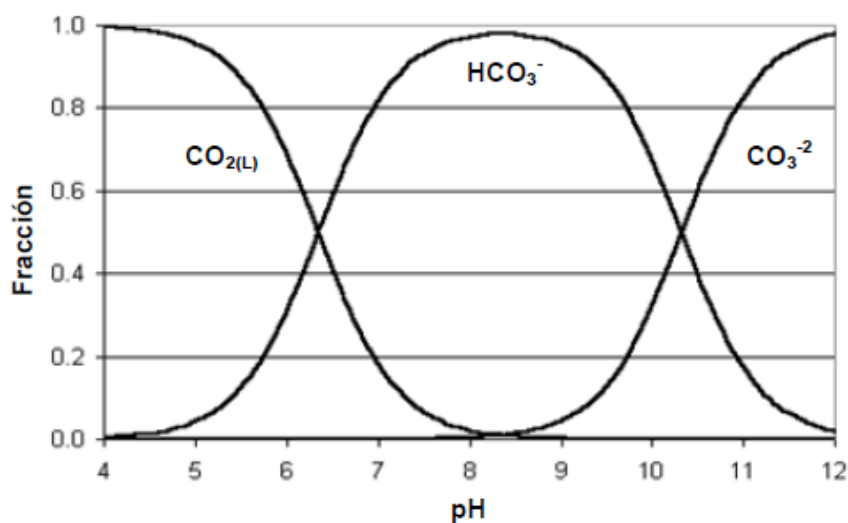


Figura 2.6: Diagrama de distribución de especies CO_2 (L), HCO_3^- y CO_3^{2-} en agua.

Aunque el sustrato verdadero de la enzima Rubisco es el CO_2 , debido a la baja concentración en la que esta especie se encuentra en medio acuoso, las células de microalga consumen preferencialmente bicarbonato como fuente de carbono, mediante el Mecanismo de Concentración de CO_2 (MCC). De esta manera, se mantiene una alta concentración de CO_2 en torno a Rubisco, favoreciendo la carboxilación por sobre la oxigenación (Tchernov *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2011).

El HCO_3^- no puede ingresar a la célula por difusión como lo realiza la molécula de CO_2 sin carga, por lo tanto su ingreso debe ser mediado por transporte activo o debe ser previamente convertido a CO_2 acuoso por medio de la enzima anhidrasa carbónica (AC) que se encuentra en la superficie externa de la célula. La enzima anhidrasa carbónica también puede actuar en el interior de la célula a nivel del citoplasma y del cloroplasto, convirtiendo el bicarbonato que ingresa por transporte activo a CO_2 disuelto, suministrando CO_2 a Rubisco por deshidratación del HCO_3^- acumulado, tal como se muestra en la Figura 2.7 (Douglas *et al.*, 2003; Lee, 2008; Jansson y Northen, 2010; Ho *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011).

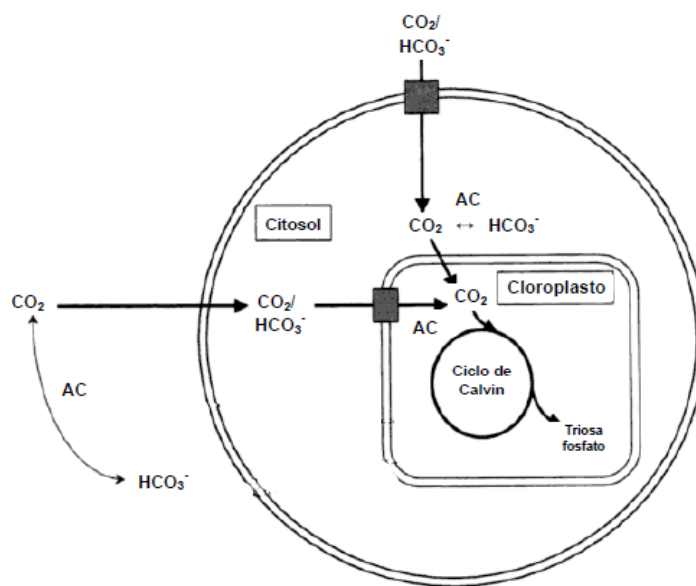
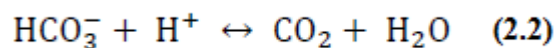


Figura 2.7: Esquema para transporte de carbono inorgánico en células de algas eucariotas vía transporte activo de CO_2 y HCO_3^- . (Los cuadros sombreados representan transporte activo) (Douglas et al., 2003).

El método de transporte de carbono inorgánico depende de la especie de microalga. Por ejemplo, *Nannochloropsis gaditana* carece de AC extracelular, pero puede utilizar HCO_3^- como fuente de carbono mediante transporte activo, para posteriormente convertirlo a CO_2 en el interior de la célula mediante una enzima AC intracelular (Huertas et al., 2000; Forján et al., 2007). La microalga *Tetraselmis gracilis* puede utilizar bicarbonato gracias a la presencia de la enzima AC extracelular y AC intracelular (Rigobello-Masini et al., 2003). Por otra parte, *Nannochloris atomus* y *Nannochloris maculata* consumen preferencialmente CO_2 mediante su transporte a través de la membrana celular (Huertas y Lubián, 1998).

La conversión del ión bicarbonato a CO_2 acuoso durante la fotosíntesis produce el consumo de un protón (ecuación 2.2), lo que causa un gradual aumento de pH. Se pueden alcanzar pH tan altos como 11 para cultivos con alta concentración de microalgas donde no se le ha agregado CO_2 adicional (Moheimani, 2005):



Cuando el pH del medio aumenta, el equilibrio tiende hacia el ión carbonato. El ión carbonato es impermeable a la membrana plasmática de la célula de microalga y no existe un mecanismo conocido para su ingreso, por lo que no puede ser asimilable por los microorganismos (Thoms *et al.*, 2001).

Aunque el CO₂ es el principal nutriente de la biomasa microalgal y es necesario su inyección al medio de cultivo para mejorar la productividad, cuando el cultivo se expone a una atmósfera con una alta concentración de CO₂ se puede producir inhibición del crecimiento (Silva y Pirt, 1984; Kurano y Miyachi, 2005). Las respuestas a altas concentraciones de CO₂ son dependientes de la especie. Por ejemplo: cuando se trasladó la microalga *Stichococcus bacillaris* Nägeli desde aire a una atmósfera con 40% de CO₂, sólo pudo sobrevivir durante 2 días y posteriormente se inhibió completamente; en cambio, cuando se trasladó a la microalga *Chlorococum littorale* a 40% de CO₂, su crecimiento disminuyó durante los primeros días pero después se restableció e incluso alcanzó velocidades mayores a las obtenidas en aire (Iwasaki *et al.*, 1996). Se han observado que varias especies poseen buena tolerancia a altas concentraciones de CO₂, como se muestra en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Productividad de diferentes especies de microalga frente a atmósferas con alto contenido de CO₂ (Wang et al., 2008; Brennan y Owende, 2010; Ho et al., 2011; Kumar et al., 2011). Donde P_x es productividad volumétrica de la biomasa y P_{CO₂} es productividad de captura de CO₂.

Microalga	%CO ₂	P _x (g L ⁻¹ d ⁻¹)	P _{CO₂} (g L ⁻¹ d ⁻¹)
<i>Chlorococcum littorale</i>	20	0,53	0,9
<i>Chlorococcum littorale</i>	50	0,044	0,082
<i>Chlorella</i> sp.	10	0,106	-
<i>Chlorella</i> sp.	15	0,099- 1	1,88
<i>Chlorella</i> sp.	20	0,700	1,316
<i>Chlorella</i> sp.	40	-	1,0
<i>Chlorella</i> sp.	50	0,386 - 0,95	0,725 - 1,79
<i>Chlorella kessleri</i>	18	0,087	0,163
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	0,105 - 0,273	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	15	-	0,624
<i>Scenedesmus</i> sp.	10	0,188- 0,218	0,460
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10	0,29	0,55
<i>Scenedesmus obliquus</i>	18	0,14	0,26
<i>Botryococcus braunii</i>	10	0,027	-
<i>Botryococcus braunii</i>	Gas de combustión	0,077	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	16 - 34	0,076	0,143
<i>Spirulina</i> sp.	12	0,22	0,413
<i>Nannochloris</i> sp	15	0,35	0,658
<i>Nannochloropsis</i> sp	15	0,3	0,564
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	15	0,15	0,282
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	60	-	2,47
<i>Aphanothece microscópica Nageli</i>	15	0,77	1,44

Las diferencias entre las capacidades de captura de CO₂ para las distintas especies de microalga mostradas en la Tabla 2.5, también pueden ser provocadas por las condiciones experimentales: previa aclimatación de la cepa, medio de cultivo utilizado, intensidad de luz y diseño del fotobiorreactor.

2.4.3. Generación de O₂ mediante fotosíntesis:

La generación de oxígeno durante la remoción fotosintética de CO₂ es importante debido a dos razones: por un lado altas concentraciones de oxígeno disuelto pueden inhibir el crecimiento de la biomasa microalgal; y por otra parte altas

concentraciones de oxígeno en la fase gaseosa del fotobiorreactor pueden producir mezclas explosivas con metano.

La inhibición del crecimiento de la biomasa debido a altas concentraciones de O_2 disuelto se debe a la inhibición de la fotosíntesis, lo que puede ocurrir debido a dos razones: Una, en altas concentraciones de O_2 se favorece la función de oxigenasa por sobre la función de carboxilasa de la enzima Rubisco que participa en el Ciclo de Calvin (Richmond, 2004); otra, en combinación con una alta intensidad de luz, se puede producir un daño oxidativo sobre los fotosistemas del cloroplasto (Chisti, 2007). Algunas especies de microalgas sufren daños con concentraciones de O_2 disuelto superiores a 300 y 400 % del valor de saturación del O_2 en fase acuosa en contacto con aire. Mientras que otras especies más sensibles, pueden sufrir inhibición a concentraciones mayores a sólo 120% del valor de saturación en contacto con aire (Chisti, 2007; Posten, 2009).

En un proceso de remoción de CO_2 desde biogás, especial cuidado debe ser aplicado para evitar la formación de mezclas explosivas metano-oxígeno. Mezclas de metano y oxígeno puro son explosivas con un contenido de oxígeno superior a 40% (Hopp, 1994; Mandeno *et al.*, 2005). Además, para la utilización del biogás como combustible vehicular o para su inyección en la red de gas domiciliaria, se exige un contenido de oxígeno menor a 1%, como se señala en Tabla 2.1.

La remoción del exceso de O_2 en el cultivo de microalgas puede ser abordada aumentando la turbulencia y/o promoviendo la desorción del O_2 en un cultivo expuesto a la atmósfera (Suh y Lee, 2003).

2.5. Biocombustibles a partir de biomasa microalgal.

Como se mencionaba anteriormente, una de las principales ventajas de la remoción fotosintética de CO_2 frente a los métodos de purificación de biogás tradicionales, es la posibilidad de usar la biomasa microalgal para la producción de

biocombustibles. El uso de microalgas como fuente de biomasa para la producción de biocombustibles es un tema de fuerte interés científico, debido a las ventajas que presenta frente a los cultivos terrestres tradicionales.

2.5.1. Biodiesel desde microalgas:

Para la elaboración de biodiesel, los triglicéridos presentes en el aceite reaccionan con metanol en una reacción denominada transesterificación, para producir metil-ésteres de ácidos grasos o biodiesel y glicerol (Chisti, 2007; Demirbas, 2011). En la Tabla 2.6, se señala una comparación entre los rendimientos de aceite por área para los distintos cultivos.

Tabla 2.6: Rendimientos de aceite para distintos cultivos (Chisti, 2007)

Cultivo	Rendimiento (L aceite/há)
Maíz	172
Soya	446
Raps	1190
Jatrofa	1892
Aceite de coco	2689
Aceite de palma	5950
Microalga (30% de aceite)*	58700
Microalga (70% de aceite)*	136900

* Porcentaje de aceite en peso seco.

Como se observa en la Tabla 2.6, las microalgas tienen la ventaja de producir 50 a 100 veces más aceite por unidad de área que cultivos tradicionales como el raps. Por otra parte, el biodiesel de microalgas no contiene azufre, no es tóxico y es altamente biodegradable (Mata *et al.*, 2010; Demirbas, 2011).

Las microalgas más estudiadas para producción de biodiesel son: *Botryococcus braunii*, *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Monallanthus*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, y *Tetraselmis*, las cuales tienen contenidos de aceite desde 15 a 75% (Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010).

2.5.2. Biogás desde microalgas:

Debido a la ausencia de lignina y bajo contenido de celulosa, la biomasa microalgal presenta buenas características para la digestión anaerobia (Singh y Gu, 2010). Además, no es un obstáculo trabajar con biomasa microalgal húmeda debido a que la digestión anaerobia es adecuada para materia orgánica con alto contenido de humedad (80-90%) (Brennan y Owende, 2010).

La biomasa microalgal puede digerirse anaeróticamente con o sin previa extracción de aceite. La producción de biogás a partir de la biomasa agotada, luego de la extracción de lípidos, es utilizada como un proceso anexo que ayuda a mejorar el rendimiento energético de la producción de biodiesel. Sin embargo, el cultivo de microalgas sólo para producción de biogás (sin extracción de lípidos) también es una alternativa interesante. Los lípidos poseen un alto contenido energético, en comparación con carbohidratos y proteínas, lo que se traduce en un mayor potencial de producción de biogás (Sialve *et al.*, 2009). En la Tabla 2.7, se señalan el potencial metanogénico obtenido para biomasa de distintas microalgas sin extracción de aceite.

Tabla 2.7: Potencial metanogénico para biomasa microalgal (Sialve *et al.*, 2009; Mussgnug *et al.*, 2010).

Sustrato	Potencial metanogénico L CH ₄ /gSV	CH ₄ (%Vol)
<i>Arthrospira platensis</i>	0,48	61
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0,59	66
<i>Chorella vulgaris</i>	0,31-0,35	68-75
<i>Chlorella kessleri</i>	0,34	65
<i>Chlorella–Scenedesmus</i> (Batch)	0,17–0,32	62-64
<i>Chlorella–Scenedesmus</i> (Continuo)	0,09-0,136	69
<i>Dunaliella salina</i>	0,51	64
<i>Euglena gracilis</i>	0,49	67
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,29	62
<i>Spirulina máxima</i>	0,26	68-72
<i>Spirulina</i>	0,32-0,31	-
<i>Tetraselmis</i> (Continuo)	0,31	72-74

Como se observa en la Tabla 2.7, el biogás proveniente de la digestión de biomasa microalgal posee un alto contenido de energía, con concentraciones de metano sobre el 60%. Por lo demás, el biogás procedente de microalgas normalmente no contiene azufre, lo cual evita corrosión en motores y tuberías (Zamalloa *et al.*, 2011).

La conversión de la biomasa microalgal en metano permitiría liberar la energía contenida en la biomasa y además, liberar nutrientes como nitrógeno y fósforo, que pueden ser recirculados al medio de cultivo de microalgas (Brennan y Owende, 2010). Al mismo tiempo, el biogás generado a partir de la digestión anaerobia de la microalga puede ser recirculado al cultivo, permitiendo la recirculación del carbono y la obtención de un biogás de mayor calidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Microalga Modelo y Medio de Cultivo

La microalga marina que se utiliza como modelo es la llamada *Nannochloropsis gaditana*, obtenida desde la unidad de microbiología aplicada de la Universidad de Antofagasta, Chile. Esta es perteneciente a la clase Eustigmatophyta. Posee una forma elipsoidal, con un tamaño de $3,5 - 4 \times 2,5 - 3 \mu\text{m}$ (Lubian, 1982). Se destaca de ella su alto contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) (Richmond, 2004). Algunos estudios reportan un contenido de lípidos en un rango de 12 a 68% (Chisti, 2007, Mata et al., 2010; Chen et al., 2011), siendo una posible materia prima para biodiesel.

El medio de cultivo utilizado para la experiencia fue el medio f/2 para microalgas marinas enriquecido con N y P para suplir las necesidades nutritivas (tabla 3.1). El medio fue preparado con agua de mar filtrada proveniente de las costas de la comuna de Puerto Saavedra, Región de la Araucanía, IX Región, Chile.

Tabla 3.1: Medio de cultivo f/2 enriquecido con N y P.

Composición	Concentración
NaNO ₃	4 mM (0,34 g L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	0,2 mM (0,027 g L ⁻¹)
Solución de micronutrientes	1 mL L ⁻¹
Solución de micronutrientes	
Na ₂ EDTA	4,16 g L ⁻¹
FeCl ₃ * 6H ₂ O	3,15 g L ⁻¹
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,01 g L ⁻¹
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,022 g L ⁻¹
CoCl ₂ * 6H ₂ O	0,01 g L ⁻¹
MnCl ₂ * 4H ₂ O	0,18 g L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,006 g L ⁻¹

3.2 Configuración de los reactores:

Se implementó un reactor anaerobio de una capacidad de 4,5 L de volumen útil (Figura 3.1), conectado en línea a un fotobiorreactor de microalgas de un volumen útil de 2,2 L acoplado a una columna de intercambio gaseoso de 0,125 L de volumen útil (Figura 3.2 y 3.3). El reactor anaerobio proporciona el biogás necesario para la experiencia.

En el fotobiorreactor se evaluó el rendimiento y la factibilidad de la captura biológica del CO₂ aplicando dos niveles de circulación.

3.2.1 Biorreactor anaerobio:

El reactor se inoculó con lodo anaerobio proveniente de la planta de tratamiento de la empresa CCU en Temuco, Región de la Araucanía.

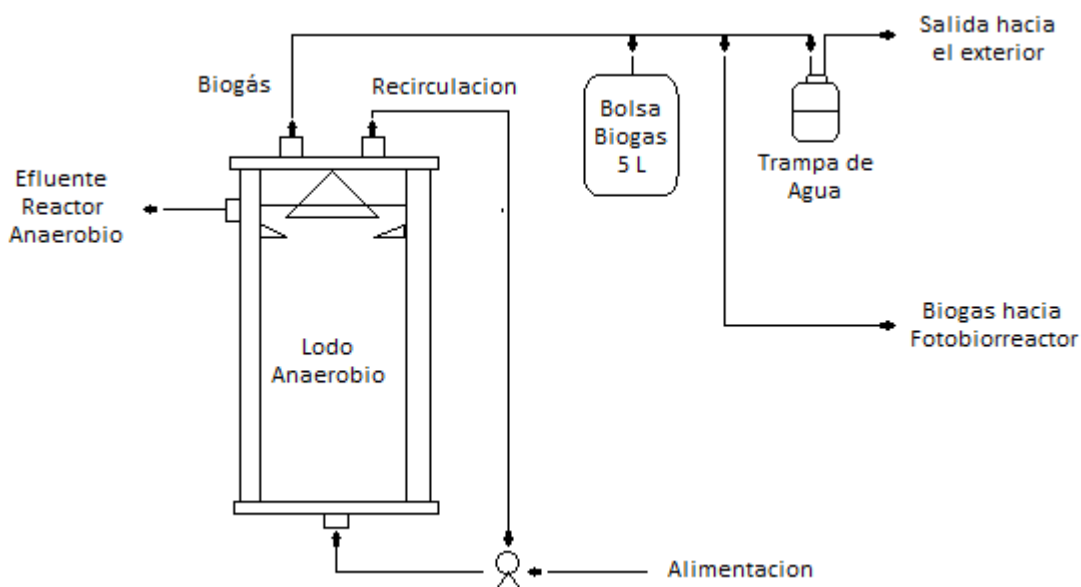


Figura 3.1: Esquema del reactor anaerobio utilizado para la producción de biogás

El reactor anaerobio operó bajo la configuración presentada en la Figura 3.1, a una temperatura de 30°C, proporcionada por un baño termo-regulado que se usó para circular agua caliente por la chaqueta del reactor.

El reactor fue alimentado con una solución compuesta principalmente por etanol, peptona y agua destilada, adicionalmente se agregó bicarbonato de sodio para mantener el pH en rangos cercanos a 7.

El reactor se operó con un flujo de 1 ml min^{-1} con la ayuda de una bomba peristáltica. El efluente del reactor fue recolectado a través de un rebalse simple para mantener el volumen del reactor anaerobio constante.

La velocidad de carga orgánica (VCO) fue aumentada paulatinamente por medio del aumento de la demanda química de oxígeno (DQO) de alimentación, durante la etapa de puesta en marcha, hasta alcanzar una condición de producción necesaria para el experimento.

Se fijó una recirculación del líquido del reactor a una velocidad superficial de $0,3 \text{ m/h}$ con el fin de mantener agitación en el reactor.

3.2.2 Fotobiorreactor continuo acoplado a columna de intercambio de gases:

El fotobiorreactor operó con una columna de intercambio gaseoso para lograr controlar la presencia de O_2 en el biogás de salida. La configuración de éste está representada en las Figuras 3.2 y 3.3.

Se utilizó un fotoperiodo continuo de 24 horas luz con una intensidad aproximada de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y temperatura promedio de 25° C .



Figura 3.2: Fotografía de fotobiorreactor conectado a columna de intercambio de gases.

El contenido del fotobiorreactor fue continuamente circulado hacia la columna por medio de una bomba peristáltica. El biogás fue suministrado continuamente desde el reactor anaerobio y burbujeado por el fondo de la columna de manera de generar la transferencia de CO_2 desde la fase gaseosa a la fase líquida. El cultivo enriquecido con carbono inorgánico retorna al fotobiorreactor por medio de un rebalse.

El gas tratado fue recirculado a una velocidad de 150 ml min^{-1} para por lo tanto se asumió que la columna posee un patrón de flujo de mezcla completa para fines de los balances de masa.

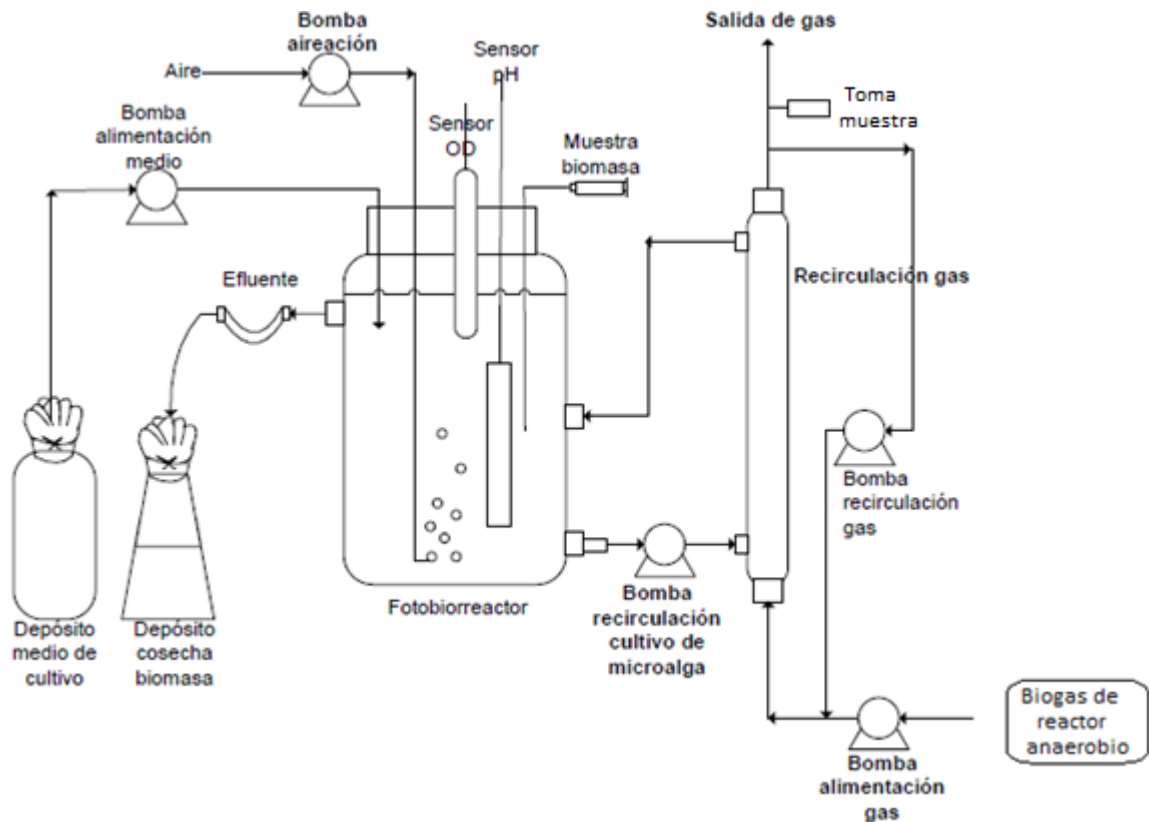


Figura 3.3: Esquema fotobiorreactor conectado a columna de intercambio de gases.

El pH fue monitoreado y controlado en línea mediante un electrodo sumergible ubicado al interior del fotobiorreactor. El control se llevó a cabo mediante la variación del flujo de biogás (CH_4/CO_2). Tanto el sensor de pH como la bomba de alimentación de gas, fueron conectadas a un sistema adquirente de datos (compactaq, National Instruments), permitiendo su monitoreo y control con la ayuda del programa *Labview 8.6*.

La alimentación del medio de cultivo fue realizada mediante una bomba peristáltica con un flujo de 0,1 ml/min. Este flujo se utilizó para mantener una tasa de dilución de $0,07 \text{ d}^{-1}$ (Meier, 2011). Se adecuó un rebalse simple para recolectar el efluente y así mantener un volumen constante dentro del fotobiorreactor.

La concentración de biomasa y de CO₂ disuelto en la fase líquida del reactor se determinó semanalmente. A su vez, se realizó un seguimiento de 2 a 3 veces por semana de la concentración de CO₂ y O₂ en el biogás de entrada y de salida.

3.3 Operación de los Reactores:

3.3.1 Producción de biogás del reactor anaerobio:

La DQO de la alimentación fue fijada de manera tal que el reactor fuera capaz de producir un total teórico aproximado de 10 L día⁻¹ de biogás, para ello se fijó una VCO de 7.

Se midió semanalmente la DQO de la salida del reactor anaerobio, con el fin de determinar el porcentaje teórico de producción de biogás. De igual manera se midió cada 2 semanas el volumen de biogás producido por día.

El pH fue medido periódicamente cada 2 o 3 días, tomando una muestra desde el sobrenadante de la fase líquida, utilizando un pHmetro portátil (*Thermo Scientific Orion*), con el fin de comprobar y chequear que el pH se mantuviera en niveles cercanos a 7.

La medición de los ácidos grasos volátiles se realizó se realizó en un cromatógrafo de gases *Perkin Elmer* modelo *Clarus 400*, utilizando un detector de ionización de flama (Flame Ionization Detector, FID).

La composición del biogás fue determinada de 2 a 3 veces en la semana con el fin de comprobar las concentraciones de CO₂ y CH₄

3.3.2 Factibilidad de la absorción de CO₂ por la biomasa microalgal, en diferentes fases de recirculación:

Para corroborar como afecto de la velocidad de intercambio de masa que existe entre el fotobiorreactor y la columna en relación a la absorción del CO₂ del

biogás, se realizó un experimento donde se utilizaron dos diferentes velocidades de recirculación entre estas dos fases, con el fin de buscar un rendimiento óptimo entre el porcentaje del O₂ y CO₂ en la salida del biogás según las normativas para uso del biogás como combustible vehicular y/o para su inyección en la red de gas domiciliaria (Tabla 2.1)

Para evaluar la factibilidad técnica en diferentes niveles de circulación, se operó el sistema según el esquema indicado en las Figuras 3.2 y 3.3. Las velocidades de recirculación utilizadas fueron 5 ml m⁻¹ y 7 ml m⁻¹.

El desempeño del fotobiorreactor fue evidenciado a través de un modelo teórico desarrollado a partir de los balances de masa para CO₂ y O₂, tanto en la fase líquida como en la fase gaseosa. Para el desarrollo de los balances de masa se consideraron las siguientes suposiciones:

- El sistema se encontraba en estado estacionario.
- El volumen del fotobiorreactor y de la columna de intercambio de gases era constante.
- Tanto el fotobiorreactor como la columna de intercambio de gases poseían un patrón de flujo de tipo mezcla completa.
- Todas las formas solubles de carbono inorgánico se combinaron en una sola variable representada por el símbolo CID (carbono inorgánico disuelto).
- Se consideró pH constante.

Para la microalga *Nannochloropsis gadinata* se ha descrito una velocidad de crecimiento específico (μ) de 0,07 d⁻¹ y un rendimiento YO₂/CO₂ de 1,04 molO₂ mol⁻¹CO₂ (Meier, 2011), valores que son fundamentales en el balance de masa.

En la Figura 3.4 se muestra el esquema del fotobiorreactor con la nomenclatura utilizada para la realización de los balances de masa.

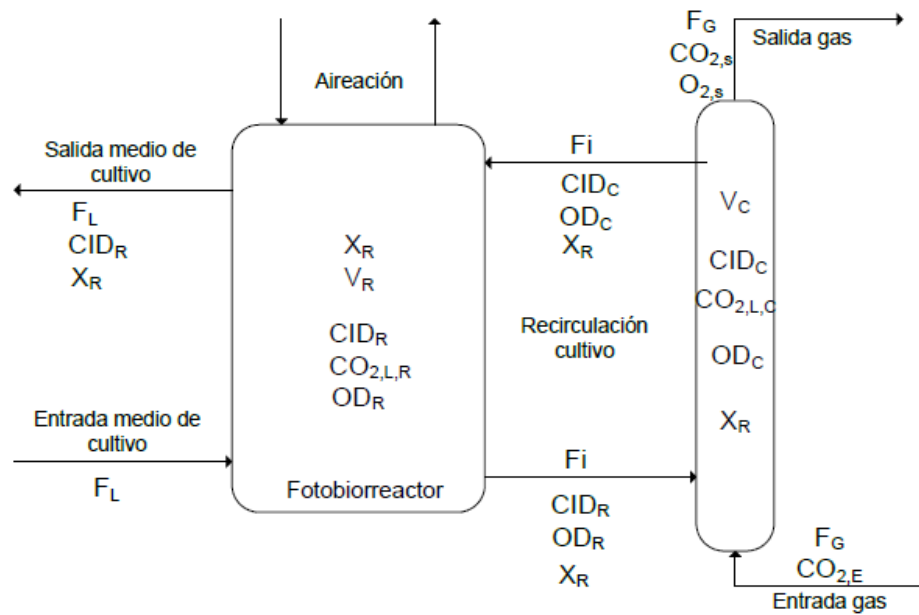


Figura 3.4: Nomenclatura variables fotobiorreactor conectado a columna de intercambio de gases.

FG: flujo de gas. **FL:** flujo medio de cultivo. **Fi:** flujo recirculación de cultivo reactor-columna. **XR:** concentración biomasa reactor. **V:** volumen. **CO_{2,E}** y **CO_{2,S}**: concentración de CO₂ en el gas de entrada y de salida. **O_{2,S}**: concentración de O₂ en el gas de salida. **CO₂*** y **O₂***: concentración de CO₂ y de O₂ disuelto en equilibrio con la fase gaseosa. **CID:** concentración de carbono inorgánico disuelto (CO_{2,L}+HCO₃⁻+CO₃⁻²). **CO_{2,L}:** concentración de CO₂ disuelto. **OD:** concentración de O₂ disuelto. **Subíndices R y C** indican concentración en reactor y en columna, respectivamente

La Tabla 3.2 describe los balances de masa en la fase gaseosa y en la fase líquida de la columna de intercambio de gases y en el fotobiorreactor.

Tabla 3.2: Balances de CO₂ y O₂ en fotobiorreactor unido a columna de intercambio de gases.

<i>Balances de CO₂ en el sistema</i>	
Fase gaseosa columna	$F_G * CO_{2,E} - F_G * CO_{2,S} = K_{La_{CO_2,C}} (CO_{2,C}^* - CO_{2,L,C}) V_C$
Fase líquida columna	$F_i * CID_C - F_i * CID_R = K_{La_{CO_2,C}} (CO_{2,C}^* - CO_{2,L,C}) V_C$
Fase líquida fotobiorreactor	$F_i * CID_C - F_i * CID_R$ $= F_L * CID_R + K_{La_{CO_2,R}} (CO_{2,L,R} - CO_{2,R}^*) V_R + \mu X V_R \frac{Y_{CO_2}}{X}$
Balance global	$F_G * CO_{2,E} - F_G * CO_{2,S}$ $= F_L * CID_R + K_{La_{CO_2,R}} (CO_{2,L,R} - CO_{2,R}^*) V_R + F_L X \frac{Y_{CO_2}}{X}$
<i>Balances de O₂ en el sistema</i>	
Fase gaseosa columna	$F_G * O_{2,S} = K_{La_{O_2,C}} (OD_C - OD_C^*) V_C$
Fase líquida columna	$F_i * OD_R - F_i * OD_C = K_{La_{O_2,C}} (OD_C - OD_C^*) V_C$
Fase líquida fotobiorreactor	$F_i * OD_R - F_i * OD_C = \mu X V_R \frac{Y_{O_2}}{X} - K_{La_{O_2,R}} (OD_R - OD_R^*) V_R$
Balance global	$F_G * O_{2,S} = F_L X \frac{Y_{O_2}}{X} - K_{La_{O_2,R}} (OD_R - OD_R^*) V_R$

$K_{La_{CO_2}}$ y $K_{La_{O_2}}$: coeficiente de transferencia de masa para CO₂ y O₂. $Y_{CO_2/X}$ e $Y_{O_2/X}$: rendimientos CO₂/biomasa y O₂/biomasa.

3.4 Metodología analítica

3.4.1. Crecimiento de la biomasa microalgal.

La concentración y crecimiento de la biomasa microalgal se determinó mediante la medición de sólidos suspendidos volátiles (SSV), de acuerdo al método 2540 de *Standard Methods* (APHA *et al.*, 1998).

3.4.2. Concentración de CO₂ y de O₂ disuelto.

La concentración de carbono inorgánico disuelto (CID) y de dióxido de carbono disuelto (CO₂(L)) en la fase líquido de los fotobiorreactores, se calculó mediante el método descrito por MacKereth *et al* 1978, utilizando los valores de pH y

alcalinidad total (Roldán y Ramírez, 2008). El método de cálculo se detalla en la Tabla 3.4.

Tabla 3.3: Método de cálculo de las formas de carbono inorgánico disuelto.

CID total (mmol L ⁻¹)	$[(1 + R_1 + R_2)/(1 + 2 * R_2)] * A_T$
CO _{2,L} (mmol L ⁻¹)	$[R_1/(1 + 2 * R_2)] * A_T$
HCO ₃ ⁻ (mmol L ⁻¹)	$[1/(1 + 2 * R_2)] * A_T$
CO ₃ ⁻² (mmol L ⁻¹)	$[R_2/(1 + 2 * R_2)] * A_T$

Donde: $R_1 = 10^{(pK_1 - pH)}$, $R_2 = 10^{(pH - pK_2)}$, A_T es la alcalinidad total (meq L⁻¹). K_1 y K_2 son las constantes de solubilidad a la temperatura y salinidad determinadas (Tabla 2.4).

La alcalinidad total se determinó mediante el método 2320 B de *Standard Methods* (APHA et al., 1998).

La concentración de oxígeno disuelto en el fotobiorreactor se determinó mediante medidor portátil marca Thermo Orion (U.S.A.) modelo 3-STAR RDO.

Durante los experimentos el pH fue medido mediante electrodo sumergible Oakton WD 35805-23.

3.4.3. Concentración de CH₄, CO₂ y de O₂ en la fase gaseosa.

La concentración de O₂ y de CO₂ en la fase gaseosa fue comprobada semanalmente mediante detector TCD en cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Clarus 500.

3.4.4 Cálculo de coeficiente de transferencia de masa gas-líquido:

El coeficiente de transferencia de masa gas-líquido (K_{La}) para oxígeno fue determinado mediante el método dinámico. Primero, se desoxigenó el líquido burbujando nitrógeno puro. Posteriormente, se burbujó aire en el mismo flujo que el experimento. Se registró el aumento en la concentración de oxígeno disuelto mediante electrodo portátil Thermo Orion (U.S.A.) modelo 3-STAR RDO, hasta que se alcanzó la concentración de equilibrio con la fase gaseosa. El coeficiente K_{LaO_2}

fue calculado a partir de la pendiente de la regresión lineal, como se muestra en la ecuación 3.1 (Babcock *et al.*, 2002; Hulatt y Thomas, 2011)

$$\ln \left((C^* - C_0) / (C^* - C) \right) = K_L a_{O_2} (t - t_0) \quad (3.1)$$

Donde: C^* es la concentración de oxígeno disuelto en equilibrio con el aire, C_0 es la concentración de oxígeno disuelto en el inicio del burbujeo de aire ($t=0$) y C es la concentración de oxígeno disuelto en un punto de la experiencia ($t - t_0$) durante el burbujeo de aire.

El coeficiente de transferencia de masa para dióxido de carbono fue estimado a partir de la relación descrita en la ecuación 3.2 (Mook, 2000; Doucha *et al.*, 2005).

$$K_L a_{CO_2} = K_L a_{O_2} (D_{CO_2} / D_{O_2})^{1/2} \quad (3.2)$$

Donde: $(D_{CO_2} / D_{O_2})^{1/2}$ y son los coeficientes de difusión para el CO_2 y para el O_2 . De acuerdo a los valores reportados en literatura, la relación $(D_{CO_2} / D_{O_2})^{1/2}$ es aproximadamente 0,9 (Mook, 2000).

4. RESULTADOS

4.1 Factibilidad de captura de CO₂ a través de fotobiorreactor unido a columna de intercambio de gas.

4.1.1 Operación Fotobiorreactor

El resultado de la operación del fotobiorreactor durante 63 días se muestra en la Figura 4.1

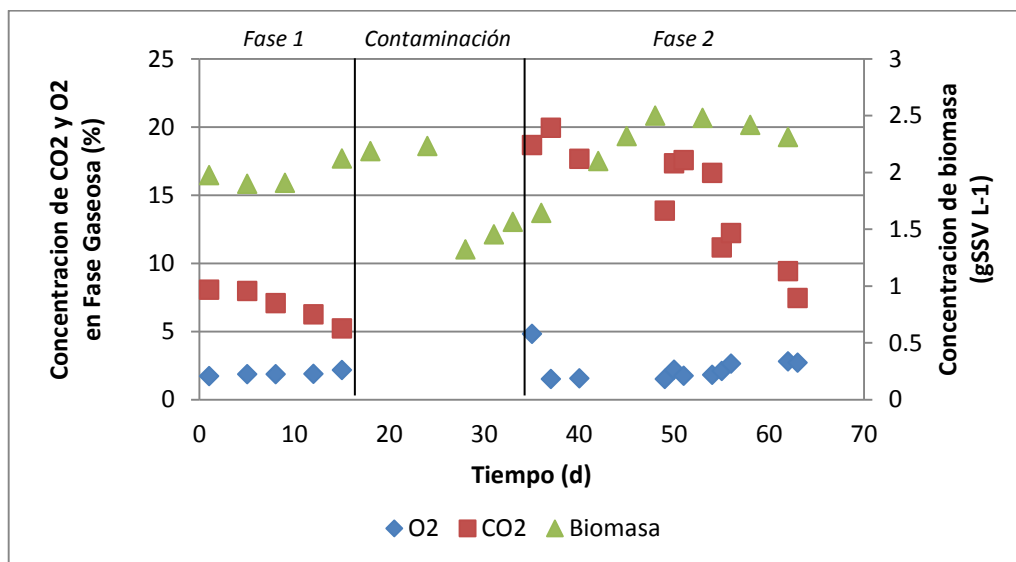


Figura 4.1: Monitoreo fotobiorreactor continuo acoplado a columna de intercambio de gases (%CO₂ y %O₂ salida reactor. Concentración de biomasa microalgal en la fase líquida del reactor).

El fotobiorreactor fue operado en dos fases, la primera comprende desde el día 0 partiendo con una microalga en estado estacionario, hasta el día 15, momento en el cual se produjo una contaminación con cianobacteria dentro del cultivo. Se optó por eliminar el cultivo utilizado hasta ese momento debido a que las condiciones utilizadas para el experimento son ideales para el crecimiento de este tipo de microorganismos.

Durante la operación en este primer periodo, la concentración de biomasa se mantuvo en niveles cercanos a los $1,9 \text{ g L}^{-1}$, los cuales se encuentra entre valores reportados para fotobiorreactores ($1 - 7 \text{ g L}^{-1}$) (Eriksen, 2008; Brennan y Owende, 2010). Se utilizó un flujo de recirculación reactor-columna (F_i) de $7,5 \text{ L d}^{-1}$. Se generó un burbujeo de aire en el reactor, con el fin de reproducir las condiciones de desorción de un reactor *raceway*.

Durante el primer periodo de operación del reactor se logró obtener una buena eficiencia de remoción de CO_2 . La concentración de CO_2 de salida llegó a niveles cercanos al 5,0 %, lo que significa una remoción aproximada de un 87% del CO_2 presente en el gas de entrada. Un monitoreo periódico de la concentración de CO_2 en el gas de entrada al reactor, mediante cromatografía gaseosa, indicó valores de 30% a 35%. Debido a que se mantuvo una baja concentración de CO_2 en el gas producido por el reactor anaerobio, la presión parcial de CO_2 en la fase gaseosa en el interior del reactor se mantuvo baja y no se presentó inhibición del crecimiento de la biomasa microalgal.

La concentración de O_2 obtenida en la salida alcanzó valores del orden de 2%. Este valor no provocaría problemas de formación de mezclas explosivas en el gas de salida. Se han reportado concentraciones de O_2 en reactores utilizados para purificación de biogás, en un rango de 2,4 a 6%, sin peligro de formación de mezclas explosivas (Mandeno *et al.*, 2005).

Estos bajos niveles de CO_2 y O_2 en la fase gaseosa se deben principalmente al bajo flujo de recirculación reactor-columna, asemejándose a los valores obtenidos en estudios previos por Meier (2011).

El control de pH instalado en el fotobiorreactor mantuvo un pH promedio de $7,5 \pm 0,2$ durante toda la operación del fotobiorreactor, a través de la inyección de gas con 30% de CO_2 en un flujo promedio de $1,2 \pm 0,1 \text{ mL min}^{-1}$ (flujo evaluado a 25°C y 1 atm) (Figura 4.2).

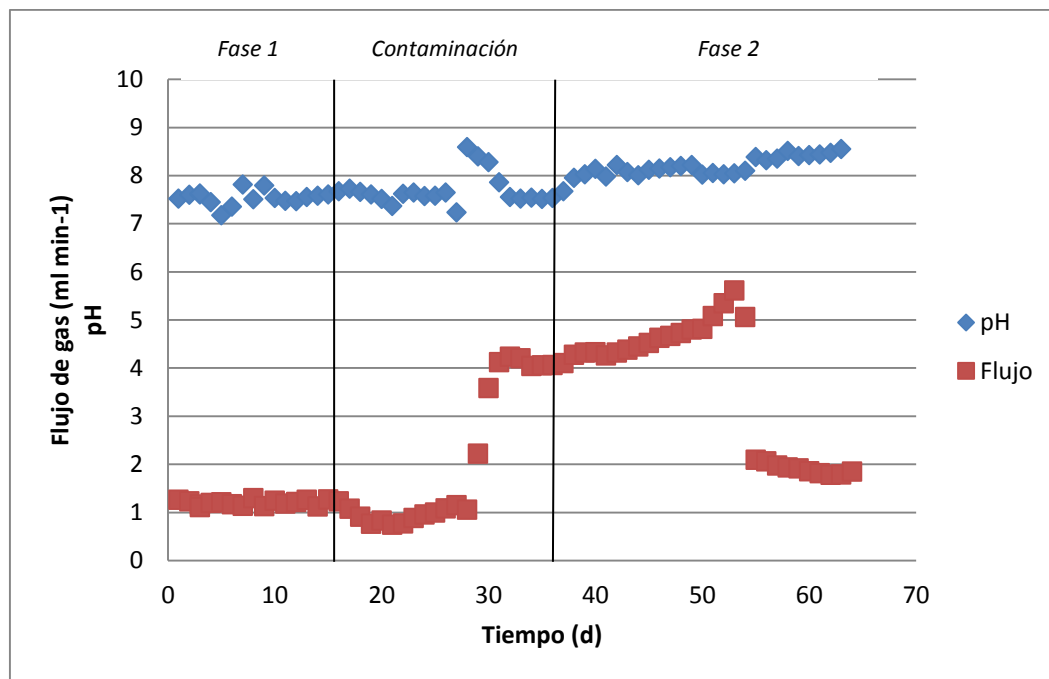


Figura 4.2: Monitoreo del flujo de gas de alimentación y pH del fotobiorreactor continuo acoplado a columna de intercambio de gases.

El concentración de oxígeno disuelto (OD) en la primera fase experimental se mantuvo constante en valores cercanos a 8,5, mientras que la concentración carbono inorgánico disuelto (CID) en el reactor se mantuvo en valores cercanos a 7 mM (Figura 4.3), debido a que el carbono fue suministrado a medida que fue consumido por la biomasa microalgal, mediante el control de pH en la fase líquida del fotobiorreactor. Asimismo, el valor de CO₂ disuelto en el reactor se mantuvo en torno a 0,1 mM, debido a que su concentración depende del pH y de la concentración de CID.

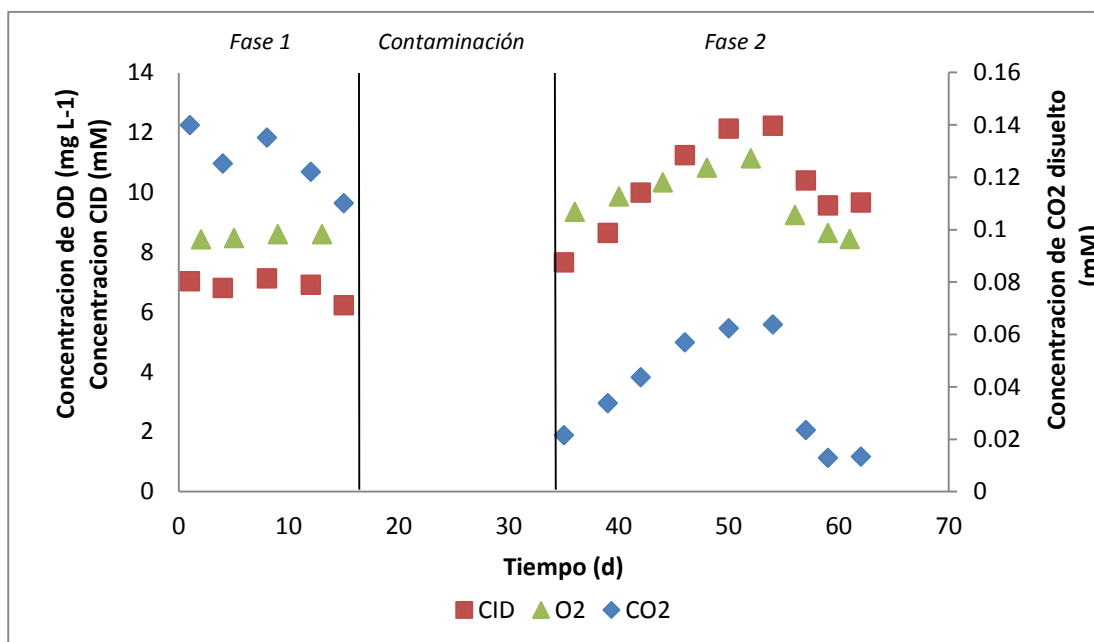


Figura 4.3: Concentración de CO₂ y de O₂ disuelto en la fase líquida fotobiorreactor acoplado a columna.

Posterior al primer periodo de tiempo se generó un nuevo cultivo a partir del día 25, el cual alcanzó el estado estacionario en el día 35, contemplándose en adelante el segundo periodo del reactor, hasta el día 63.

La concentración de biomasa obtenida durante este periodo de tiempo ronda valores cercanos a 2,3 g L⁻¹. Se decidió aumentar el Fi a un valor de 10 L d⁻¹, Ya que el valor de Fi influye en el incremento y disminución de las concentraciones de O₂ y CO₂. Se ha demostrado que el aumento en este flujo produce un incremento de la concentración de O₂ y una disminución CO₂ en el gas tratado y visversa (Meier, 2011) con el fin de evaluar los cambios en los porcentajes de CO₂ y O₂ en el gas de salida.

Se optó por modificar el flujo de aireación para alcanzar un K_{La} de O₂ en el reactor de 6,7 con el fin de generar una mayor desorción del mismo; por otra parte, el

control de pH fue modificado para mantener un promedio de $8,5 \pm 0,2$ alrededor del día 55.

Para poder reducir el flujo de biogás que se presenta en la Figura 2.3, ya que se estaba llegando a una limitación de producción de biogás por parte del reactor anaerobio. Este incremento en el flujo de alimentación, fue para mantener el nivel de pH requerido.

Se observaron aumentos en las cantidades de CID y OD en el reactor, así como una disminución de la concentración de CO_2 disuelto.

El aumento del OD puede ser causado por un aumento de la actividad fotosintética de la microalga, relacionado al aumento de su concentración comparada con el periodo anterior.

Niveles de pH por sobre 8.0 permite que la mayor parte del carbono se presente en forma de HCO_3^- , lo cual explica el aumento del CID, debido a que la concentración de este elemento es mayor al CO_2 disuelto, la microalga utiliza este ion para la producción de CO_2 , generando un aumento gradual del pH (Moheimani, 2005)

La alimentación de biogás presentó valores de 35% de CO_2 , el flujo de gas se estabilizó posterior al cambio del control promediando un flujo de $2,2 \pm 0,1 \text{ mL min}^{-1}$ (flujo evaluado a 25°C y 1 atm) (Figura 4.2).

Durante el segundo periodo la eficiencia de remoción de CO_2 fue un 79% con respecto al primero, dando como resultado niveles de concentración de CO_2 cercanos a 7,5% en el gas de salida. El monitoreo periódico de la concentración de CO_2 en el gas de entrada al reactor indicaron valores de 30% a 35% para este segundo periodo.

La concentración de O_2 en la salida se mantuvo cerca de un 2,5% en el gas de salida, este bajo valor no presenta riesgo de generar una mezcla explosiva. El aumento del valor de F_i , genera a su vez un aumento en el O_2 de salida en el biogás (Meier, 2012), a pesar de esto el O_2 se mantuvo en niveles similares al primer

periodo. Éste es atribuible al efecto del aumento de la desorción por medio del incremento del K_{La} en el reactor.

4.1.2 Análisis de la capacidad de captura fotosintética de CO₂ desde biogás del sistema propuesto.

Los balances de masa de de CO₂ y O₂ fueron realizado conforme a la tabla descrita anteriormente (Figura 3.2), utilizando los resultados previos obtenidos. De esta forma se logró obtener los valores correspondientes a los balances para compararlos con los experimentales para los dos periodos experimentales (Figuras 4.4 y 4.6).

Durante el primer periodo, representado en la Figura 4.4, fue posible obtener una concentración de CO₂ y O₂ en el gas de salida de 5,24% y 2,2% respectivamente, lo cual coincidió con los valores determinados teóricamente, que fueron de 5,25% para CO₂ y 2,7% para O₂.

Se presenta una diferencia en el balance O₂, al comparar los resultados teóricos y experimentales de 0,5%. Estos pueden deberse a que hay una mayor eliminación de este gas de la que arroja el balance, ya sea por medio de la desorción o por el efluente líquido, aunque esta baja diferencia también es atribuible a los rangos de error de los cálculos realizados.

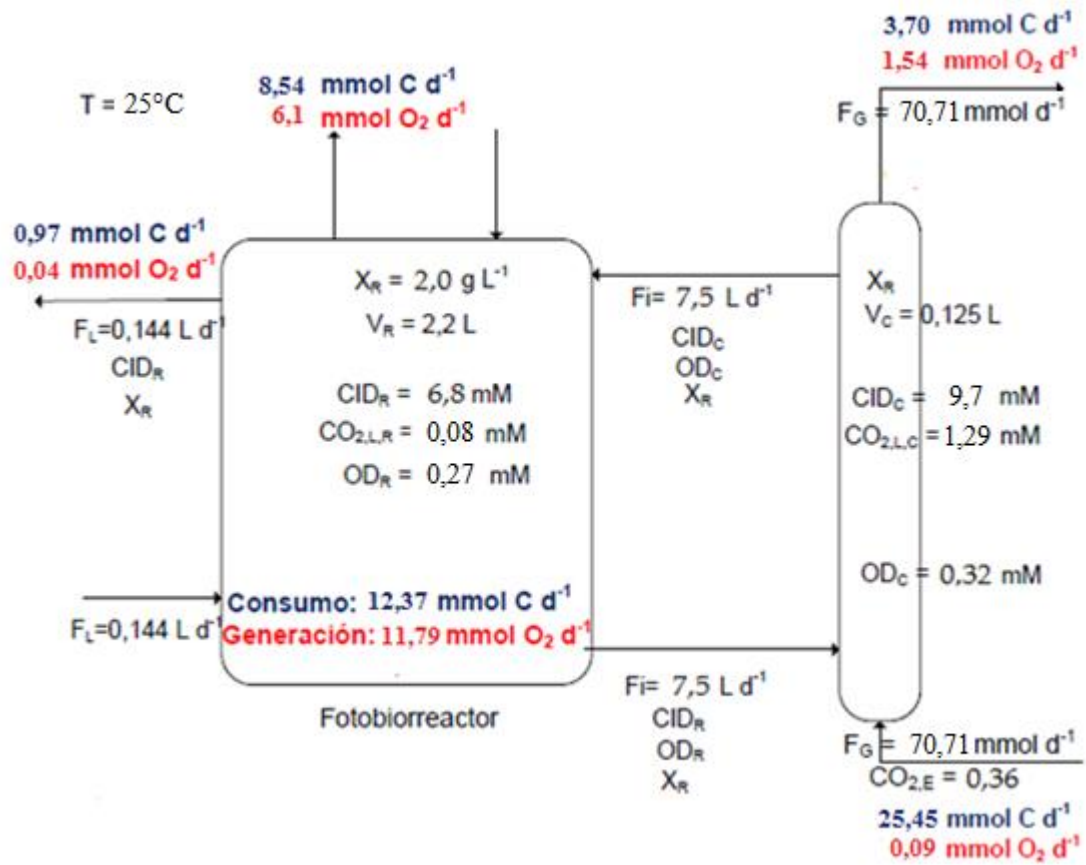


Figura 4.4: Balance de masa para de la primera fase experimental CO₂ y O₂ con $F_i = 7,5 \text{ L d}^{-1}$ ($T = 25^{\circ}\text{C}$; $F_G = 1,2 \text{ mL min}^{-1}$; $V \text{ molar gas} = 24,52 \text{ L mol}^{-1}$).

Por lo tanto un valor de $F_i = 7,5 \text{ L d}^{-1}$, nos permite obtener una remoción de CO₂ del 85,5% en gas de salida. Lo cual es comprobado por medio del balance global de carbono que se presenta en la Figura 4.5.

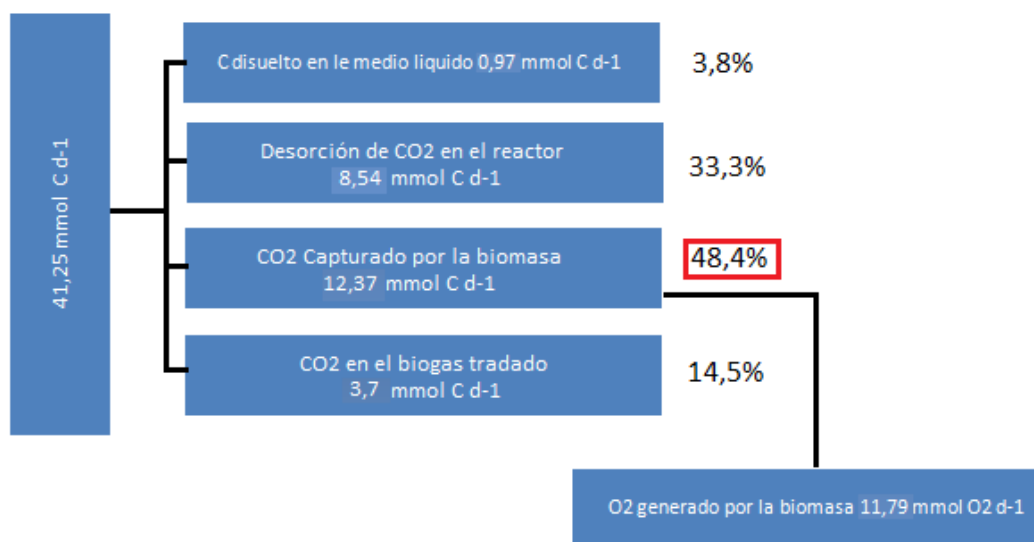


Figura 4.5: Balance global del carbono en fotobiorreactor acoplado a columna, durante la primera fase experimental.

Se puede observar del balance global dentro del sistema, que un 48,4% del CO_2 presente en el medio es capturada por la masa microalgal, mientras que un 33,3% se desorbe desde el reactor hacia el ambiente y la menor parte se pierde de forma diluida en el efluente.

Durante el segundo periodo experimental, representados en la Figura 4.6, fue posible obtener una concentración de CO_2 y O_2 en el gas de salida de 7,58% y 2,67% respectivamente, lo cual coincidió con los valores determinados teóricamente, que fueron de 7,4% para CO_2 y 2,7% para O_2 .

Por lo tanto un valor de $F_i = 10 \text{ L d}^{-1}$, nos permite obtener una remoción de CO_2 del 78,86% en gas de salida. Lo cual es comprobado por medio del balance global de carbono que se presenta en la Figura 4.7.

Se esperaba que con este valor de F_i la concentración de CO_2 obtenida en el gas de salida fuera menor al periodo anterior, pero el cambio de pH, así como el incremento del CID y el K_{La} , produjo que generara una mayor concentración de CO_2 en el gas tratado, así como una mayor desorción de este al ambiente.

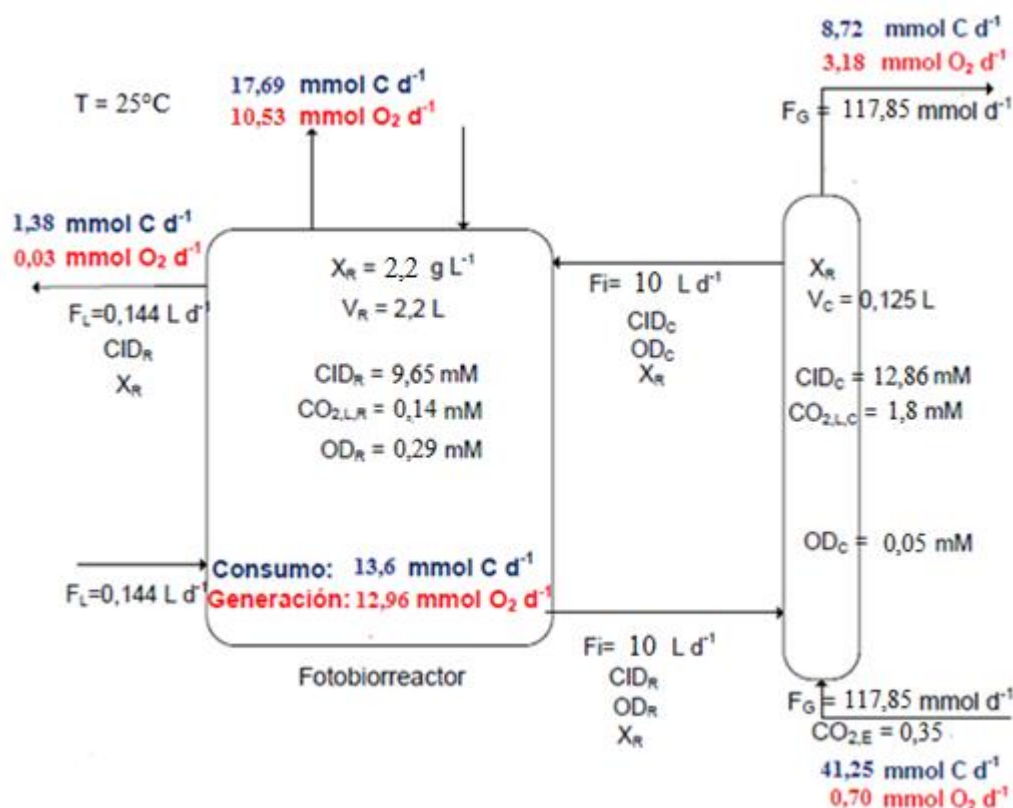


Figura 4.6: Balance de masa del CO₂ y O₂ con $F_i=10 \text{ L d}^{-1}$, para la segunda fase experimental ($T= 25^\circ\text{C}$; $F_G= 2 \text{ mL min}^{-1}$; $V \text{ molar gas}=24,52 \text{ L mol}^{-1}$).

El balance global del carbono dentro del sistema se detalla en la Figura 4.7, como se aprecia para las condiciones comprendidas en el segundo periodo de tiempo, fue posible lograr una remoción de CO₂ presente en el biogás de un orden del 78,6%.

Sin embargo como se observa en la Figura 4.7, en esta ocasión solo el 33% del CO₂ presente en el medio es capturado por la biomasa microalgal, la mayor parte correspondiente al 42,7% se desorbe hacia el ambiente y un 3,3% se elimina disuelta en el efluente.

Las altas tasas de desorción de CO₂ obtenidas en ambos periodos de tiempo, desde el fotobiorreactor, se debe básicamente a que la concentración de CO₂ disuelto en el reactor es alrededor de 10 veces mayor que la concentración de CO₂ disuelto en equilibrio con aire.

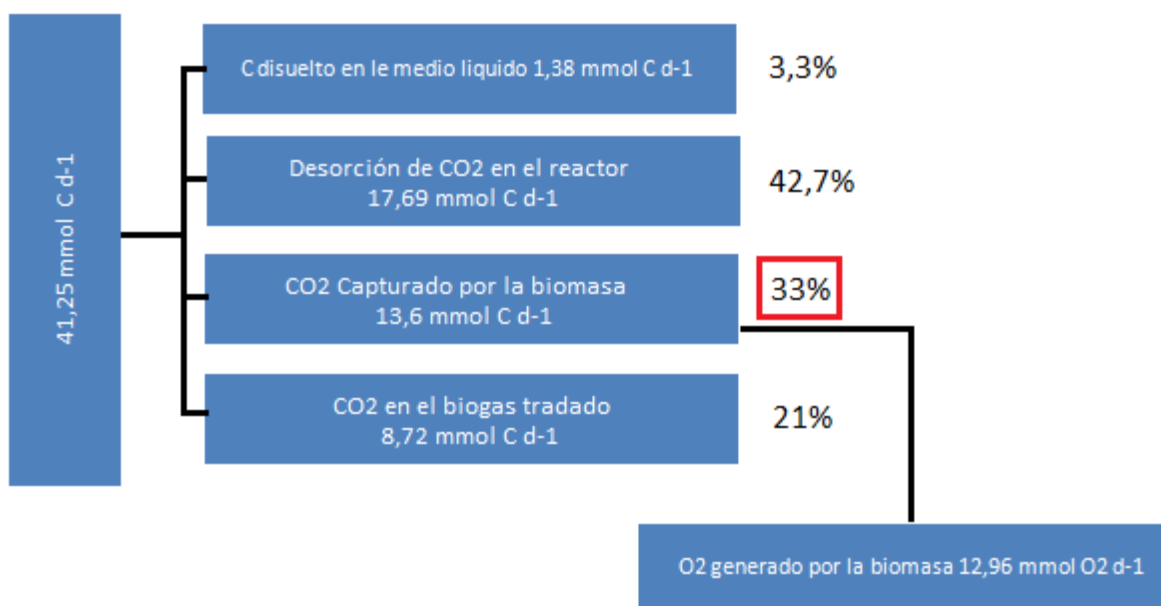


Figura 4.7: Balance global de carbono en fotobiorreactor acoplado a columna, para la segunda fase experimental.

Los parámetros operacionales pueden ser manejados para optimizar la concentración de CO_2 y de O_2 en biogás tratado son el flujo de recirculación del cultivo de microalgas (F_i) y la relación entre el volumen de la columna y el volumen del reactor (V_C/V_R),

Adicionalmente se pudo observar que a mayor el nivel de K_{La} en el reactor generado por la aireación se observa una mejor desorción del oxígeno, ya que a pesar del aumento de F_i , el nivel de O_2 se mantuvo por bajo el 3%.

Este cambio en el K_{La} también afecta al aumento de en la desorción de CO_2 liberándose una gran cantidad este al ambiente, con un 42,7% del totas del gas tratado. Estos factores se deben considerar en el desarrollo para la aplicación de futuros biorreactores.

5. CONCLUSIONES

Como ya se ha demostrado, un aumento en el flujo de recirculación produce un aumento en la concentración de O_2 y una disminución de la concentración de CO_2 en el gas tratado, y viceversa. Mientras que una mayor relación VC/VR favorece una mayor transferencia gas-líquido de CO_2 , reduciendo su concentración en el gas tratado, pero a su vez favorece la transferencia líquido-gas de O_2 aumentando su concentración en el gas tratado, lo que puede ser compensado con un aumento de la desorción aumentando el K_{La} del fotobiorreactor. Mediante la manipulación de estas variables sería posible alcanzar un valor óptimo para la concentración de CO_2 y de O_2 en el gas tratado.

Por lo tanto, es posible concluir que la captura fotosintética de CO_2 desde biogás, a través de un fotobiorreactor acoplado a un equipo de transferencia de masa externo es un proceso factible. A pesar de esto, aún es necesario llevar los procedimientos anteriormente dichos a una escala mayor, aplicando un sistema que posea una relación Vc/Vr más favorable, con el fin de analizar el comportamiento de la captura CO_2 ; apuntando a una optimización de éste, lo cual permitirá generar un sistema viable y sustentable para la aplicación del mismo a nivel industrial, logrando la generación de un biogás de calidad, aplicable como una alternativa para el gas natural, permitiendo de esta manera ser utilizando en líneas domiciliarias o como combustible vehicular.

Sin embargo, y debido a que en una instalación a escala real, generalmente se usan fotobiorreactores tipo *raceway* para el cultivo de microalgas, se deberá mantener un cuidado especial con las altas tasas de desorción de CO_2 que son emitidas hacia el ambiente en la aplicación de este proceso.

6. REFERENCIAS

- APHA, AWWA y WEF. (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20 Ed. APHA, Washington DC.
- Babcock, R.W., Malda, J. y Radway, J.C. (2002). Hydrodynamics and mass transfer in a tubular airlift photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* **14**(3): 169-184.
- Bagus, M. (2009). "Identification of algae growth kinetics ". Trabajo para optar al título de Agricultural and Bioresource Engineering. Wageningen University, Wageningen.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2006). Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. 1ra Ed. Taylor y Francis, New York.
- Brennan, L. y Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae--A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**(2): 557-577.
- Campbell, M. y Shawn, F. (2004). Bioquímica. 4ta Ed. Editorial Thomson, México.
- Conde, J.L., Moro, L.E., Travieso, L., Sanchez, E.P., Leiva, A., Dupeirón, R. y Escobedo, R. (1993). Biogas purification process using intensive microalgae cultures. *Biotechnology Letters* **15**(3): 317-320.
- Contreras, C., Peña, J., Flores, L. y Cañizares, R. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia* **28**(8): 450-456.

- Converti, A., Oliveira, R.P.S., Torres, B.R., Lodi, A. y Zilli, M. (2009). Biogas production and valorization by means of a two-step biological process. *Bioresource Technology* **100**(23): 5771-5776.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J. y Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* **102**(1): 71-81.
- Chen, C. y Durbin, E. (1994). Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* **109**: 83-94.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* **25**(3): 294-306.
- Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Tsai, M.T., Ong, S.C., Chen, C.H. y Lin, C.S. (2009). Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology* **100**(2): 833-838.
- Demirbas, A. (2011). Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Applied Energy* **88**(10): 3541-3547.
- Doucha, J., Straka, F. y Lívanský, K. (2005). Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* **17**(5): 403-412.
- Douglas, S., Larkum, A. y Raven, J. (2003). Photosynthesis in algae. 1ra Ed. Kluwer Academic.

- Dunn, I., Heinzle, E., Ingham, J. y Prenosil, J. (2003). *Biological Reaction Engineering* 2da Ed. Wiley, Weinheim
- Eriksen, N., Riisgård, F., Gunther, W. y Lønsmann Iversen, J. (2007). On-line estimation of O₂ production, CO₂ uptake, and growth kinetics of microalgal cultures in a gas-tight photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* **19**(2): 161-174.
- Eriksen, N.T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters* **30**(9): 1525-1536.
- Forján, E., Garbayo, I., Casal, B. y Vílchez, C. (2007). Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Microbiology Book Series, VOL. I: 356-364. Formatex, Badajoz.
- Granum, E. y Myklestad, S.M. (2002). A photobioreactor with pH control: demonstration by growth of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Journal of Plankton Research* **24**(6): 557-563.
- Grobbelaar, J.U. (2009). Factors governing algal growth in photobioreactors: the "open" versus "closed" debate. *Journal of Applied Phycology* **21**(5): 489-492.
- Grobbelaar, J.U. y Soeder, C.J. (1985). Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds. *Journal of Plankton Research* **7**(4): 497-506.

- Guillard, R. y Ryther, J. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana*, *Hustedt* and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. . *Can. J. Microbiol.* **8**: 229-239.
- Harun, R., Davidson, M., Doyle, M., Gopiraj, R., Danquah, M. y Forde, G. (2011). Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass & Bioenergy* **35**: 741-747.
- Herringshaw, B. (2009). "A study of biogas utilization efficiency highlighting internal combustion electrical generator units. ". Trabajo para optar al título de Agricultural Engineering. Ohio State University, Ohio
- Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Lee, D.-J. y Chang, J.-S. (2011). Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems — A review. *Biotechnology Advances* **29**(2): 189-198.
- Hopp, V. (1994). Fundamentos de Tecnología Química. 1ra Ed. Editorial Reverté S.A., Madrid.
- Hsueh, H.T., Li, W.J., Chen, H.H. y Chu, H. (2009). Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **95**(1): 33-39.
- Huertas, I.E., Espie, G.S., Colman, B. y Lubian, L.M. (2000). Light-dependent bicarbonate uptake and CO₂; efflux in the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Planta* **211**(1): 43-49.
- Huertas, I.E. y Lubián, L.M. (1998). Comparative study of dissolved inorganic carbon utilization and photosynthetic responses in *Nannochloris*

(Chlorophyceae) and *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) species. *Canadian Journal of Botany* **76**(6): 1104-1108.

- Huguen, P. y Le Saux, G. Perspectives for a european standard on biomethane: a Biogasmax proposal. http://www.biogasmax.eu/media/d3_8_new_lmcbgx_eu_standard_14dec10_vf_077238500_0948_26012011.pdf. (visitada el 15 de febrero de 2012).
- Hulatt, C.J. y Thomas, D.N. (2011). Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. *Bioresource Technology* **102**(10): 5775-5787.
- Hullu, J., Maassen, J., Van Meel, P., Shazad, S. y Vaessen, J. Comparing different biogas upgrading techniques. <http://students.chem.tue.nl/ifp24/BiogasPublic.pdf>. Eindhoven. (visitada el 5 de enero de 2012).
- INN. (2010). "Biometano - Especificaciones". NCh 3213. Of 2010. Santiago, Chile.
- Iwasaki, I., Kurano, N. y Miyachi, S. (1996). Effects of high-CO₂ stress on photosystem II in a green alga, *Chlorococcum littorale*, which has a tolerance to high CO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **36**(3): 327-332.
- Jansson, C. y Northen, T. (2010). Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Current Opinion in Biotechnology* **21**(3): 365-371.

- James, L., Charles, C., Michael, S., Stephen R. (1988) Handbook on biogas utilization.
- Jiang, L., Luo, S., Fan, X., Yang, Z. y Guo, R. (2012). Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Applied Energy* **In Press, Corrected Proof**.
- Kao, C.-Y., Chiu, S.-Y., Huang, T.-T., Dai, L., Hsu, L.-K. y Lin, C.-S. (2012). Ability of a mutant strain of the microalga *Chlorella* sp. to capture carbon dioxide for biogas upgrading. *Applied Energy* **In Press, Corrected Proof**.
- Kapdi, S.S., Vijay, V.K., Rajesh, S.K. y Prasad, R. (2005). Biogas scrubbing, compression and storage: perspective and prospectus in Indian context. *Renewable Energy* **30**(8): 1195-1202.
- Kumar, K., Dasgupta, C.N., Nayak, B., Lindblad, P. y Das, D. (2011). Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology* **102**(8): 4945-4953.
- Kurano, N. y Miyachi, S. (2005). Selection of microalgal growth model for describing specific growth rate-light response using extended information criterion. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **100**(4): 403-408.
- Lastella, G., Testa, C., Cornacchia, G., Notornicola, M., Voltasio, F. y Sharma, V.K. (2002). Anaerobic digestion of semi-solid organic waste: biogas production and its purification. *Energy Conversion and Management* **43**(1): 63-75.
- Lee, R. (2008). Phycology. 4ta Ed. Cambridge University, New York.

- Lubián, L. (1982). *Nannochloropsis gaditana* sp.nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa* **4**: 287-293.
- Madigan, M.T. y Martinko, J.M. (2006). Brock Biology of Microorganisms. 11° Ed. Pearson, New Jersey.
- Mackereth SJ, Heron J, Talling JF. (1978). *Water analysis: some revised methods for limnologist*. Freshwater Biological Association. Scientific Publications N° 36. Titus Wilson and Sons Ltda. Kendall. London.
- Manahan, S. (2007). Introducción a la química ambiental. 1ra Ed. Reverté Ediciones, México.
- Mandeno, G., Craggs, R., Tanner, C., Sukias, J. y Webster-Brown, J. (2005). Potential biogas scrubbing using a high rate pond. *Water Sci Technol* **51**(12): 253-256.
- Mann, G., Schlegel, M., Schumann, R. y Sakalauskas, A. (2009). Biogas conditioning with microalgae. *Agronomy Research* **7**(1): 33-38.
- Mata, T.M., Martins, A.A. y Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**(1): 217-232.
- Meier, L. (2011). Remoción fotosintética de CO₂ mediante microalgas, una alternativa para aumentar el poder calorífico del biogás. Trabajo para optar al grado de magister en ciencias de la ingeniería mención biotecnología.

- Megard, R.O., Tonkyn, D.W. y Senft, W.H. (1984). Kinetics of oxygenic photosynthesis in planktonic algae. *Journal of Plankton Research* **6**(2): 325-337.
- Melis, A., Neidhardt, J. y Benemann, J. (1998). *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *Journal of Applied Phycology* **10**(6): 515-525.
- Moheimani, N. (2005). "The culture of coccolithophorid algae for carbon dioxide bioremediation". Trabajo para optar al título de Doctor of Philosophy. Murdoch University Perth, Australia
- Molina Grima, E., Fernández, F.G.A., García Camacho, F. y Chisti, Y. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology* **70**(1-3): 231-247.
- Mook, W. (2000). Environmental Isotopes in the Hydrological Cycle 1. 1ra Ed. UNESCO/IAEA, Groningen.
- Mussgnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A. y Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology* **150**(1): 51-56.
- Packer, M. (2009). Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. *Energy Policy* **37**: 3428-3437.
- Pavlostathis, S.G. and Giraldo-Gomez E. (1991). Kinetics of Anaerobic Treatment. *Water Science and Technology* **24** (8), 35-59.

- Persson, M., Jönsson, O. y Wellinger, A. Biogas upgrading to vehicle fuel standards and grid injection. http://www.iea-biogas.net/_download/publi-task37/upgrading_report_final.pdf. (visitada el 15 de enero de 2012).
- Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences* **9**(3): 165-177.
- Pruvost, J., Cornet, J.F. y Legrand, J. (2008). Hydrodynamics influence on light conversion in photobioreactors: An energetically consistent analysis. *Chemical Engineering Science* **63**(14): 3679-3694.
- Rasi, S. Biogas composition and upgrading to biomethane. <http://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/20353/9789513936181.pdf?sequence=1>. Jyväskylä, Finland. (visitada el 30 de noviembre de 2011).
- Reynolds, C. (2006). The Ecology of Phytoplankton. 1ra Ed. Cambridge University, New York.
- Richmond, A. (2004). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. 1ra Ed. Blackwell Science, Oxford.
- Rigobello-Masini, M., Aidar, E. y Masini, J.C. (2003). Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta). *Brazilian Journal of Microbiology* **34**: 267-272.
- Rocha, J.M.S., Garcia, J.E.C. y Henriques, M.H.F. (2003). Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering* **20**(4-6): 237-242.

- Roldán, G. y Ramírez, J. (2008). Fundamentos de limnología neotropical. 2da Ed. Universidad de Antioquía, Medellín
- Ryckebosch, E., Drouillon, M. y Vervaeren, H. (2011). Techniques for transformation of biogas to biomethane. *Biomass and Bioenergy* **35**(5): 1633-1645.
- Satoh, A., Kurano, N. y Miyachi, S. (2001). Inhibition of photosynthesis by intracellular carbonic anhydrase in microalgae under excess concentrations of CO₂. *Photosynthesis Research* **68**(3): 215-224.
- Schubert, R. y Blasch, J. (2010). Sustainability standards for bioenergy—A means to reduce climate change risks? *Energy Policy* **38**(6): 2797-2805.
- Sforza, E., Bertucco, A., Morosinotto, T. y Giacometti, G.M. (2012). Photobioreactors for microalgal growth and oil production with *Nannochloropsis salina*: From lab-scale experiments to large-scale design. *Chemical Engineering Research and Design* **In Press, Corrected Proof**
- Sialve, B., Bernet, N. y Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances* **27**(4): 409-416.
- Silva, H.J. y Pirt, S.J. (1984). Carbon Dioxide Inhibition of Photosynthetic Growth of *Chlorella*. *J Gen Microbiol* **130**(11): 2833-2838.
- Singh, J. y Gu, S. (2010). Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**(9): 2596-2610.

- Sobczuk, M., García Camacho F, Camacho Rubio F, Acién Fernández FG y E., M.G. (2000). Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. *Biotechnol Bioeng.* **67**(4): 465-475.
- Sobczuk, T.M., Camacho, F.G., Rubio, F.C., Fernández, F.G.A. y Grima, E.M. (2000). Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* **67**(4): 465-475.
- Soubes M. (1994). Microbiología de la digestión anaerobia. III Taller Latinoamericano sobre Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales, Montevideo, Uruguay. 15 – 28.
- Stumm, W. y Morgan, J. (1995). Aquatic Chemistry. 3ra Ed. John Wiley & Sons Inc, New York.
- Suh, I.S. y Lee, C.G. (2003). Photobioreactor engineering: Design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **8**(6): 313-321.
- Sydney, E.B., Sturm, W., de Carvalho, J.C., Thomaz-Soccol, V., Larroche, C., Pandey, A. y Soccol, C.R. (2010). Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology* **101**(15): 5892-5896.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X. y Zhong, J. (2011). CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology* **102**(3): 3071-3076.

- Tchernov, D., Hassidim, M., Luz, B., Sukenik, A., Reinhold, L. y Kaplan, A. (1997). Sustained net CO₂ evolution during photosynthesis by marine microorganism. *Current biology : CB* **7**(10): 723-728.
- Thoms, S., Pahlow, M. y Wolf-Gladrow, D.A. (2001). Model of the Carbon Concentrating Mechanism in Chloroplasts of Eukaryotic Algae. *Journal of Theoretical Biology* **208**(3): 295-313.
- Travieso, L., Sanchez, E.P., Benitez, F. y Conde, J.L. (1993). *Arthrospira* sp. intensive cultures for food and biogas purification. *Biotechnol Lett* **15**: 1091-1094
- Wang, B., Li, Y., Wu, N. y Lan, C. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**(5): 707-718.
- Watson, M.K. (2009). "Determination and Modeling of Growth and Biomass Production Rate of Freshwater Algae as a Function of Media Carbon Content". Trabajo para optar al título de Master of Science Biosystems Engineering. Clemson University, Clemson
- Wellinger, A. y Lindberg, A. Biogas upgrading and utilization. http://www.iea-biogas.net/_download/publi-task37/Biogas%20upgrading.pdf. (visitada el 20 de febrero de 2012).
- Williams, P.J. y Robertson, J.E. (1991). Overall planktonic oxygen and carbon dioxide metabolisms: the problem of reconciling observations and calculations of photosynthetic quotients. *Journal of Plankton Research* **13**: 153-169.

- Yoo, C., Jun, S.-Y., Lee, J.-Y., Ahn, C.-Y. y Oh, H.-M. (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology* **101**(1, Supplement 1): S71-S74.
- Zamalloa, C., Vulsteke, E., Albrecht, J. y Verstraete, W. (2011). The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology* **102**(2): 1149-1158.