

TESIS DE DOCTORADO

**PRODUCCIÓN DE
ALGAS UNICELULARES
Y BIOESTIMULACIÓN
EN LECHUGA**

Edmundo René Recalde Posso

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN AGRARIA Y
FORESTAL

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

2021

1

D./Dña. **Edmundo René Recalde Posso**

Título da tese: **Producción de algas unicelulares y bioestimulación en lechuga**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Ibarra, Ecuador, 30 de julio de 2021.

Firma electrónica





AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

1

D./Dña. **María Rosa Mosquera Losada**

En condición de: **Director/a**

Título da tese: **Producción de algas unicelulares y bioestimulación en lechuga**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dña Edmundo René Recalde Posso, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Lugo, 25 de Outubro de 2021

Sinatura electrónica





AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

D./Dna.	Luis Roca Pérez
En condición de:	Director/a
Título da tese:	Producción de algas unicelulares y bioestimulación en lechuga

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna Edmundo René Recalde Posso, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Lugo, 25 de Outubro de 2021

Sinatura electrónica



Agradecimiento

Han pasado algunos años desde que me propuse iniciar con esta investigación y seguro que existieron momentos en los que me desalentaba, pero gracias a mis directores María Rosa Mosquera y Luis Roca Pérez, me dieron ánimos faltando pocos meses para que culmine mi fecha límite y con su apoyo incondicional pude escribir en este tiempo todo el trabajo experimental desarrollado, mi profundo agradecimiento a ustedes.

De la misma manera a quien fue mi primer Codirector D. José María Durán, a quien el destino lo llevó muy pronto, ha sido ejemplo a seguir para mí durante todos estos años.

Expreso mi agradecimiento muy sincero a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, por el apoyo brindado para poder culminar con éxito este trabajo.

A mi esposa Maricela, por haberme dado ánimos para desarrollar este trabajo. A mis hijos Cristhian, María Gabriela y María Fernanda que son el motor principal para culminar todas las metas que me he trazado.

A mis padres, por su cariño innegable e incondicional. A mis hermanos Pablo y Anita siempre pendientes de mi avance académico.

Edmundo Recalde

Resumen

El cambio climático es una realidad que está provocando grandes pérdidas económicas a nivel global, siendo el CO₂ uno de los gases responsables del aumento de las temperaturas del planeta. Una de las posibles alternativas que pueden contribuir a mitigar el calentamiento global es el uso de microalgas como sumidero de dióxido de carbono. Considerando que las microalgas constituyen una opción viable para contribuir a la reducción de los niveles de dióxido de carbono y en vista de que éstas utilizan CO₂ como fuente de carbono, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue optimizar la patente de un fotobiorreactor para el crecimiento de microalgas en las condiciones y materiales presentes en Ecuador con el fin de escalarlo para su uso industrial, así como el uso de las microalgas en las distintas fases del ciclo de desarrollo de la lechuga.

La patente indicada consiste en un fotobiorreactor laminar para producción de microalgas en cuyo interior circulan gases de combustión. En la primera etapa se implementó un invernadero, donde se ubicaron 16 unidades fotobiorreactoras, que permitía la protección de los fotobiorreactores de los factores ambientales, así como el control de temperatura. Teniendo en cuenta que las industrias pueden tener generación intermitente de gases de combustión se diseñó un sistema de almacenamiento de estos gases que posteriormente permite distribuir a una cámara de mezcla para disminuir su concentración entre 500 a 1500 ppm de CO₂. Los paneles verticales con dimensiones de 1,3 m de alto por 0,90 m de ancho están contruidos de poliestireno expandido con cuatro cavidades, sobre esta lámina se colocó polietileno de alta densidad (sarán) como soporte para el material textil. Una bomba de recirculación permite que la solución nutritiva se distribuya por toda la lámina.

Para lograr el máximo rendimiento en producción de microalgas se realizó una evaluación de materiales textiles existentes en Ecuador (Filtro sintético, fieltro con mezcla de lana, tela polar 100% poliéster y tela tricot) que permitieran la adhesión de las microalgas, siendo la tela polar la que presentó una producción de *Scenedesmus* sp significativamente superior al resto. El sistema de encendido de bombas de recirculación se estableció que debe ser accionado durante todo el tiempo, ya que una ligera intermitencia provoca disminución de la producción.

Una vez que se optimizó el sistema de unidades fotobiorreactoras de microalgas se evaluó diferentes dosis de nutrientes en el medio recirculante obteniéndose los rendimientos significativos con dosis de 100 mgL⁻¹ de N. Por otra parte, se evaluó distintas concentraciones de CO₂ (500, 1000 y 1500 ppm de CO₂) no observándose diferencias significativas en la producción de microalgas.

Las microalgas (*Scenedesmus* sp) cultivadas en las unidades fotobiorreactoras se utilizaron para estudiar su efecto sobre el crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa*). La aplicación de microalgas en la etapa de germinación influyó positivamente en el crecimiento de la plántula a temperatura de 20°C, concentraciones de 6x10⁷ células ml⁻¹ de *Scenedesmus* sp permitieron un incremento en la longitud de la radícula en la fase de germinación. Las microalgas se aplicaron en bandejas de germinación no evidenciándose cambios significativos en la longitud de las plántulas. En un cultivo hidropónico se adicionó concentraciones de *Scenedesmus* sp vivas a la solución nutritiva de lechuga hidropónica, evidenciando que su uso durante su ciclo de cultivo provoca un incremento en la producción.

Palabras clave: Bioestimulantes, *Scenedesmus* sp, captura de gases, fotobiorreactores.

Abstract

Climate change is a reality that is causing great economic losses at a global level, with CO₂ being one of the gases responsible for the increase in temperatures on the planet. One of the possible alternatives that can contribute to mitigating global warming is the use of microalgae as a carbon dioxide sink. Considering that microalgae are a viable option to contribute to the reduction of carbon dioxide levels and in view of the fact that they use CO₂ as a carbon source, the general objective of this Doctoral Thesis was to optimize the patent of a photobioreactor for growth of microalgae in the conditions and materials present in Ecuador in order to scale it for industrial use, as well as the use of microalgae in the different phases of the lettuce development cycle.

The patent indicated consists of a laminar photobioreactor for the production of microalgae inside which combustion gases circulate. In the first stage, a greenhouse was implemented, where 16 photobioreactor units were located, which allowed the protection of the photobioreactors from environmental factors, as well as temperature control. Taking into account that industries can have intermittent combustion gas generation, a storage system for these gases was designed that later allows them to be distributed to a mixing chamber to reduce their concentration between 500 to 1500 ppm of CO₂. The vertical panels with dimensions of 1.3 m high by 0.90 m wide are made of expanded polystyrene with four cavities. High-density polyethylene (saran) was placed on this sheet as a support for the textile material. A recirculation pump allows the nutrient solution to be distributed throughout the sheet.

To achieve the maximum performance in microalgae production, an evaluation of existing textile materials in Ecuador was carried out (synthetic felt, wool blend felt, 100% polyester polar fabric and tricot

fabric) that allowed the adhesion of microalgae, being the polar fabric the one that presented a production of *Scenedesmus* sp significantly higher than the rest. The recirculation pump ignition system was established that it must be activated at all times, since a slight intermittence causes a decrease in production.

Once the microalgae photobioreactor unit system was optimized, different doses of nutrients were evaluated in the recirculating medium, obtaining significant yields with doses of $100 \text{ mgL}^{-1} \text{ N}$. On the other hand, different concentrations of CO_2 were evaluated (500, 1000 and 1500 ppm of CO_2), not observing significant differences in the production of microalgae.

The microalgae (*Scenedesmus* sp) cultivated in the photobioreactor units were used to study their effect on the growth of lettuce plants (*Lactuca sativa*). The application of microalgae in the germination stage positively influenced the growth of the seedling at a temperature of 20°C , concentrations of 6×10^7 cells ml^{-1} of *Scenedesmus* sp allowed an increase in the length of the radicle in the germination phase. The microalgae were applied in germination trays, not showing significant changes in the length of the seedlings. In a hydroponic culture, live concentrations of *Scenedesmus* sp were added to the hydroponic lettuce nutrient solution, showing that its use during its cultivation cycle causes an increase in production.

Keywords: Biostimulants, *Scenedesmus* sp, gas capture, photobioreactors.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	6
RESULTADOS.....	8
Capítulo 1. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE UNIDADES FOTOBIORREACTORAS PARA LA PRODUCCIÓN DE MICROALGAS.....	8
Resumen.....	8
Abstract.....	10
1.1 Introducción.....	12
1.2 Material y métodos.....	14
1.3 Resultados y discusión.....	15
1.3.1 Características de la estructura externa tipo invernadero para la instalación de las unidades fotobiorreactoras.....	18
1.3.2 Sistema de almacenamiento de gases de combustión.....	21
1.3.3 Sistema de distribución de los gases de combustión.....	23
1.3.4 Sistema de recirculación de solución nutritiva.....	28
1.3.5 Instalación de paneles verticales.....	32
1.3.6 Cosecha.....	34
1.4 Conclusiones.....	36
1.5 Referencias bibliográficas.....	37
Capítulo 2. EVALUACIÓN DE MATERIALES TEXTILES Y TIEMPOS DE RECIRCULACIÓN DE SOLUCIÓN NUTRITIVA EN UNIDADES FOTOBIORREACTORAS.....	41
Resumen.....	41
Abstract.....	43
2.1 Introducción.....	44
2.2 Materiales y métodos.....	46
2.2.1 Material de soporte.....	47
2.2.2 Frecuencia de activación de la recirculación.....	48
2.2.3 Determinaciones realizadas en los ensayos.....	48
2.2.4 Análisis estadístico.....	49
2.3 Resultados y discusión.....	50
2.3.1 Material de soporte.....	50
2.3.2 Frecuencia de activación de la recirculación.....	56
2.4 Conclusiones.....	62

2.5	Referencias bibliográficas	63
Capítulo 3.	OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GASES Y NUTRIENTES EN EL SISTEMA DE FOTOBIOREACTORES	65
	Resumen	65
	Abstract	67
3.1	Introducción	68
3.2	Materiales y métodos	69
3.2.1	Optimización de la dosis de nutrientes.....	69
3.2.2	Optimización de la concentración de gases.....	70
3.2.3	Determinaciones.....	70
3.2.4	Análisis estadístico	73
3.3	Resultados y discusión	73
3.3.1	Concentración de nutrientes	73
3.3.2	Optimización de la concentración de gases.....	77
3.4	Conclusiones	90
3.5.	Referencias bibliográficas	91
Capítulo 4.	CULTIVO DE LECHUGA Y BIOESTIMULACIÓN CON <i>Scenedesmus</i>	93
	Resumen	93
	Abstract.....	95
4.1	Introducción	96
4.2	Materiales y métodos.....	98
4.2.1	Germinación y evolución de la plántula en condiciones controladas	98
4.2.2	Producción de plántula de lechuga para posterior trasplante	99
4.2.3	Producción de lechuga en sistema hidropónico	100
4.2.4	Análisis estadístico	104
4.3	Resultados y Discusión.....	105
4.3.1	Efecto de las concentraciones de <i>Scenedesmus</i> sp y temperatura sobre la germinación.....	105
4.3.2	Producción de plántulas de lechuga en alveolo	109
4.3.3	Producción de lechuga en cultivo hidropónico	111
4.4	Conclusiones	115
4.5	Referencias bibliográficas	116
	CONCLUSIONES.....	119
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
	ANEXOS	123

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Vista exterior de invernadero en donde se colocaron las 16 unidades de láminas verticales para el desarrollo de ensayos de producción de algas unicelulares. (V= Ventana; VC= Ventana Cenital; UF=Unidades Fotobiorreactoras; VT= Ventiladores)	19
Figura 2. En el invernadero se aprecia en la parte superior mediante flechas una apertura (ventana cenital) para salida de aire caliente y evitar excesos de temperatura	20
Figura 3. Vista de uno de los cuatro ventiladores instalados en el invernadero	20
Figura 4. Sistema de generación, almacenamiento y mezclado de gases de combustión. 1. Generador de gases, 2. Tanque de enfriamiento, 3. Almacenamiento de gases, 4. Entrada de gases y aire, 5. Compresor.....	22
Figura 5. Mezcla de gases de combustión en la cámara de mezcla, de donde se distribuyen hacia las líneas de conducción principal de gases de combustión	24
Figura 6. Distribución de la mezcla de gases de combustión desde la línea principal a las sublíneas.	25
Figura 7. Esquema de conducción de líneas secundarias en cada uno de los subpaneles	26
Figura 8. Sistema de distribución de gases de combustión en cada una de las unidades fotobiorreactoras	27
Figura 9. Distribución homogénea de agua en la parte superior del panel vertical	28
Figura 10. Sistema de recirculación de agua. La bomba sumergible envía el agua a la parte superior del panel, retornando ésta al tanque de reserva de agua.....	30
Figura 11. Proceso de humectación del material textil	31
Figura 12. Desmineralizador de agua.....	32

Figura 13. Dimensiones del panel y de las cuatro cavidades formadas (subpaneles).....	33
Figura 14. Soporte metálico en los paneles verticales que da lugar a la unidad fotobiorreactora	34
Figura 15. Fase de producción de microalgas en los paneles verticales en donde se observa el color verde, indicativo de que las algas están desarrollándose.	35
Figura 16. Procedimiento del cosechado de algas unicelulares	35
Capítulo 2	

Figura 1. Distribución de las unidades experimentales en el invernadero	48
Figura 2. Evolución del crecimiento de las microalgas en las unidades fotobiorreactoras con distintos materiales (T1= Filtro sintético, T2= Filtro con mezcla de lana, T3= Tela polar, T4= Tela tricot.	51
Figura 3. Consumo de agua diario del material textil utilizado. T1: Filtro sintético; T2: Filtro con mezcla de lana, T3: Tela polar, T4: Tela tricot. Tratamiento con la misma letra no presenta diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).	53
Figura 4. Valores CO ₂ en cada material textil analizado. T1: Filtro sintético; T2: Filtro con mezcla de lana, T3: Tela polar, T4: Tela tricot	54
Figura 5. Evolución del pH durante el ciclo de cultivo. T1: Filtro sintético; T2: Filtro con mezcla de lana, T3: Tela polar, T4: Material sintético	55
Figura 6. Evolución del número de células en el tanque de recirculación previo a la cosecha. T1: Filtro sintético; T2: Filtro con mezcla de lana, T3: Tela polar, T4: Tela tricot	56
Figura 7. Concentración de CO ₂ por día y por tratamiento (T1: Encendido todo el tiempo; T2: 6 minutos encendido y 2 minutos apagado; T3: 5 minutos encendido y 5 minutos apagado; T4: 3 minutos encendido y 9 minutos apagado).	57

Figura 8. Concentración de CO ₂ promedio, datos tomados a las 8 am y 15 pm (T1: Encendido todo el tiempo; T2: 6 minutos encendido y 2 minutos apagado; T3: 5 minutos encendido y 5 minutos apagado; T4: 3 minutos encendido y 9 minutos apagado) Para cada tratamiento aplicado si tienen la misma letra no presenta diferencias significativas entre la mañana y tarde (Tukey, p<0,05)	58
Figura 9. Consumo de agua (T1: Encendido todo el tiempo; T2: 6 minutos encendido y 2 minutos apagado; T3: 5 minutos encendido y 5 minutos apagado; T4: 3 minutos encendido y 9 minutos apagado). Para cada tratamiento aplicado si tienen la misma letra no presenta diferencias significativas (Tukey, p<0,05)	59
Figura 10. Desarrollo de las microalgas en el material textil de soporte con relación a la frecuencia de encendido y apagado de la bomba de recirculación.	61

Capítulo 3

Figura 1. Promedio de la concentración de gases en los diferentes tratamientos realizados con la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. C1 es la concentración de CO ₂ en el tratamiento no enriquecido con este gas, CI es la concentración en el invernadero, CC es la concentración de gases a la salida del compresor y CE es la concentración de CO ₂ en el exterior del invernadero. C2, C3 y C4 son las concentraciones que se pretendían obtener y C2R, C3R y C4R son las concentraciones de CO ₂ reales para los diferentes tratamientos.	72
Figura 2. Concentración promedio de CO ₂ de los 4 subpaneles de la unidad fotobiorreactora (D1: 100 ppm; D2: 200 ppm; D3: 300 ppm; D4: 400 ppm de Nitrofoska)	74
Figura 3. Contenido de nitratos en la solución nutritiva para cada una de las dosis aplicadas (D1: 100 ppm; D2: 200 ppm; D3: 300 ppm; D4: 400 ppm de Nitrofoska)	75

- Figura 4.** Evolución del pH en la solución nutritiva en función de la concentración de CO₂ durante las diferentes fases del cultivo laminar (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂). Las líneas verticales de color verde indican los momentos de la cosecha y los asteriscos señalan diferencias significativas (Tukey p<0,05) entre las concentraciones de CO₂..... 78
- Figura 5a.** Evolución de Conductividad eléctrica (uScm⁻¹) en la solución nutritiva en función de la dosis de CO₂ durante las diferentes fases del cultivo laminar (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂). Las líneas verticales de color marrón indican los momentos de la cosecha y los asteriscos señalan diferencias significativas (Tukey p<0,05). 80
- Figura 5b.** Evolución de sólidos disueltos totales (mgL⁻¹) en la solución nutritiva en función de la dosis de CO₂ durante las diferentes fases del cultivo laminar (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂). Las líneas verticales de color marrón indican los momentos de la cosecha y los asteriscos señalan diferencias significativas (Tukey p<0,05). 81
- Figura 6.** Comportamiento del contenido de Sal en la solución nutritiva en función de la dosis de CO₂ durante las diferentes fases del cultivo laminar (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂). Las líneas verticales de color marrón indican los momentos de la cosecha y los asteriscos señalan diferencias significativas (Tukey, p<0,05) 83
- Figura 7.** Evolución de la absorbancia en las distintas fases de crecimiento celular y tratamientos (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂) 84
- Figura 8a.** Evolución del consumo (L h⁻¹ m⁻²) de agua en el día por tratamientos (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂) 86

Figura 8b. Evolución del consumo ($L h^{-1} m^{-2}$) de agua en el día y la noche por tratamientos (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO_2 , C3= 1000 ppm CO_2 , C4= 1500 ppm CO_2) 87

Capítulo 4

Figura 1. Unidad hidropónica en donde se observa la inclinación para facilitar iluminación solar en todas las plantas 102

Figura 2. Longitud de la parte aérea de plántulas de lechuga para cada tratamiento en donde interactúan temperatura con concentraciones de microalgas. T1=15°C, T2=20°C, T3=25°C; C0: sin algas; C1: 2×10^7 células ml^{-1} ; C2: 4×10^7 células ml^{-1} ; C3: 6×10^7 células ml^{-1} . Letras distintas entre los tratamientos indican diferencias significativas en la altura de la plántula (Tukey, $p < 0,05$) 107

Figura 3. Efecto de la temperatura de incubación (15, 20 y 25°C) (A) y de la concentración de microalgas *Scenedesmus sp* (B) (C0= 0, C1= 2, C2=4 y C3= 6×10^7 células ml^{-1}) en la longitud de la radícula. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$) 108

Figura 4. Evaluación de consumo de agua (T1: solución hidropónica común; T2: solución hidropónica común + suspensión de microalgas 40×10^4 cel ml^{-1} ; T3: solución hidropónica común + suspensión de microalgas media: 80×10^4 cel ml^{-1} . T4: solución hidropónica común + suspensión de microalgas alta: 120×10^4 cel ml^{-1}). 111

Figura 5. Crecimiento de microalgas por tratamiento (T1: solución hidropónica común; T2: solución hidropónica común + suspensión de microalgas 40×10^4 cel ml^{-1} ; T3: solución hidropónica común + suspensión de microalgas media: 80×10^4 cel ml^{-1} . T4: solución hidropónica común + suspensión de microalgas alta: 120×10^4 cel ml^{-1}) 112

Figura 6. Peso fresco y longitud de raíz (T1: solución hidropónica común; T2: solución hidropónica común + suspensión de

microalgas 40×10^4 cel ml^{-1} ; T3: solución hidropónica común + suspensión de microalgas media: 80×10^4 cel ml^{-1} . T4: solución hidropónica común + suspensión de microalgas alta: 120×10^4 cel ml^{-1}). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$) 113

Figura 7. Peso de hoja (T1: solución hidropónica común; T2: solución hidropónica común + suspensión de microalgas 40×10^4 cel ml^{-1} ; T3: solución hidropónica común + suspensión de microalgas media: 80×10^4 cel ml^{-1} . T4: solución hidropónica común + suspensión de microalgas alta: 120×10^4 cel ml^{-1}). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$) 114



LISTA DE TABLAS

Capítulo 1

Tabla 1. Adecuaciones a la patente.....	17
--	----

Capítulo 2

Tabla 1. Sólidos disueltos, sólidos solubles, volumen cosechado y materia seca de microalgas en tratamientos con distintos materiales textiles testados en las unidades fotobiorreactoras. Para cada parámetro analizado si los tratamientos aplicados tienen la misma letra no presenta diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).....	52
--	----

Tabla 2. Producción de materia seca ($\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$) en la cosecha de microalgas en tratamientos con distintos tiempos de encendido. Para cada cosecha si los tratamientos aplicados tienen la misma letra no presenta diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).....	60
--	----

Capítulo 3

Tabla 1. Conductividad eléctrica (CE) por cosecha semanal en $\mu\text{S cm}^{-1}$. Para cada cosecha tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas (Tukey $p < 0,05$).....	76
--	----

Tabla 2. Producción de materia seca ($\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$) en las cosechas de las algas unicelulares realizadas durante 7 semanas. Para cada cosecha los tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas (Tukey $p < 0,05$).	77
--	----

Tabla 3. Consumo promedio de agua durante el ensayo ($\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$) entre tratamientos	85
---	----

Tabla 4. Producción en Materia seca en $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$. Para cada cosecha los tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).....	88
--	----

Tabla 5. Variación del pH por cosecha y concentración de CO_2 . Para cada cosecha si los tratamientos tienen la misma letra no presentan diferencias significativas (Tukey $p < 0,05$).....	89
--	----

Capítulo 4

Tabla 1. Suspensiones de microalgas utilizadas en el ensayo	100
Tabla 2. Soluciones nutritivas aplicadas al cultivo hidropónico de lechuga.....	103
Tabla 3. Longitud de la parte aérea y radicular de plantas de lechuga crecidas en bandeja con y sin la aplicación de fertilización y suspensión de microalgas.	110



LISTA DE ANEXOS

Capítulo 1

Anexo 1. Secuencia fotográfica de la generación y distribución de gases de combustión..... 123

Anexo 2. Instalación de sistema de unidades fotobiorreactoras..... 124

Capítulo 2

Anexo 1. Secuencia fotográfica de la instalación del ensayo de material de soporte 127

Anexo 2. Condiciones climáticas en el ensayo de láminas textiles.. 128

Anexo 3. Etapas de desarrollo de algas unicelulares..... 132

Anexo 4. Medición de variables..... 136

Anexo 5. Medición de variables para ensayo de materiales textiles (Medición de pH) 137

Anexo 6. Medición de variables para ensayo de materiales textiles (Conductividad Eléctrica)..... 138

Anexo 7. Medición de variables para ensayo de materiales textiles (Sólidos Disueltos Totales) 139

Anexo 8. Medición de variables para ensayo de materiales textiles (Absorbancia) 140

Anexo 9. Promedios diarios de medición deCO₂ por material textil 141

Capítulo 3

Anexo 1. Preparación de Unidades experimentales previo al ensayo de dosis de nutriente en paneles verticales..... 143

Anexo 2. Desarrollo de crecimiento celular en la fase de preparación de unidades experimentales en ensayo de dosis de nutriente en paneles verticales 144

Anexo 3. Distribución de las unidades experimentales en el ensayo de concentraciones de CO₂ en paneles verticales 145

Anexo 4 Comunicación sobre la identificación de algas unicelulares en Fotobiorreactor 146

Anexo 5. Condiciones ambientales en el ensayo con fotobiorreactor laminar 147

Anexo 6. Comportamiento diario de variables evaluadas en fotobiorreactores.....	148
Anexo 7. Estado de las unidades fotobiorreactoras en la primera cosecha en el ensayo de concentraciones de CO ₂ en paneles verticales.....	153
Anexo 8. Estado de las unidades fotobiorreactoras al finalizar las cosechas en el ensayo de concentraciones de CO ₂ en paneles verticales.....	154

Capítulo 4

Anexo 1. Porcentaje de germinación en semillas de lechuga a diferentes concentraciones de <i>Scenedesmus</i> y temperaturas (C0: sin algas; C1: 2×10^7 células ml ⁻¹ ; C2: 4×10^7 células ml ⁻¹ ; C3: 6×10^7 células ml ⁻¹)......	155
Anexo 2. Aplicación de suspensiones de microalgas.....	156
Anexo 3. Germinación de lechuga sin aplicación de suspensiones de microalgas con 3 temperaturas	157
Anexo 4. Germinación de lechuga con aplicación de suspensiones de microalgas (C1: 2×10^7 células ml ⁻¹) con 3 temperaturas..	158
Anexo 5. Germinación de lechuga con aplicación de suspensiones de microalgas (C2: 4×10^7 células ml ⁻¹) con 3 temperaturas..	159
Anexo 6. Germinación de lechuga con aplicación de suspensiones de microalgas (C3: 6×10^7 células ml ⁻¹) con 3 temperaturas....	160
Anexo 7. Lavado de microalgas	161
Anexo 8. Medición de longitud de plántula y radícula	162
Anexo 9. Instalación de sistema hidropónico.....	163
Anexo 10. Siembra de plantas de lechuga en unidades hidropónicas	164
Anexo 11. Desarrollo vegetativo de lechuga hidropónica a los 15 días desde la siembra	165
Anexo 12. Desarrollo vegetativo de lechuga hidropónica a los 28 días desde la siembra	166
Anexo 13. Secuencia del crecimiento del cultivo de lechuga	167



INTRODUCCIÓN

Los grandes desafíos que enfrenta la humanidad a nivel mundial son la sostenibilidad medioambiental y la crisis energética debido a la excesiva dependencia de los combustibles fósiles, ya que son, aproximadamente el 80% de los requerimientos energéticos del mundo (Khoo y col., 2019), y los causantes del calentamiento global debido a la enorme emisión de gases de efecto invernadero (GEI) a la atmósfera (Sudhakar 2019). Los impactos del cambio climático están asociados con riesgos para las necesidades básicas (salud, seguridad alimentaria y agua potable) así como para el desarrollo del empleo, crecimiento económico y costo de vida (Pires, 2017). Según la Organización de las Naciones Unidas las emisiones mundiales de CO₂ han aumentado en casi un 50% desde 1990, esto está provocando cambios en nuestro planeta, con el incremento de la temperatura media mundial los océanos se calientan, hay una disminución de la masa de agua congelada, sube el nivel del mar, y se ve afectado el equilibrio de nuestro planeta. Frente a esta situación global, el uso de nuevas tecnologías de recuperación de gases de combustión permite ser parte de la solución (Naciones Unidas, 2021).

Es innegable que el dióxido de carbono es uno de los principales causantes del efecto invernadero y especial atención causan las emisiones derivadas del uso de combustibles fósiles, especialmente a partir de la combustión del carbón. Por otro lado, en los últimos años, el consumo de fertilizantes y bioestimulantes se ha incrementado notoriamente como forma de aumento de la producción de cultivos. Sin embargo, el empleo de fertilizantes es una práctica cada vez más costosa que no está exenta de poder conllevar la contaminación del medio ambiente si la dosis aplicada no son las adecuadas.

En un contexto de reducción de emisiones por parte de los diferentes sectores socioeconómicos, la industria deberá desarrollar tecnologías para una eliminación amigable de los gases de combustión que genera. Para Shabani y col. (2016) las posibles alternativas para reducir el CO₂ atmosférico pueden resumirse en: absorción química, adsorción fisico-química, membranas, criogenia, la combustión ciclo química, y la biotecnología (vegetación terrestre y algas).

Existen alternativas como la inyección de CO₂ dentro de la tierra, que pueden ser consideradas costosas; sin embargo, si se considera la posibilidad de utilizar dichos gases de combustión como una materia prima para la producción de algas unicelulares, puede ser una alternativa muy interesante para la industria, ya que se convertirían en unos sumideros reales de CO₂ (Giorgos y col., 2014). El uso de estos microorganismos constituye la forma más eficiente de fijación de CO₂, desde el punto de vista fotosintético, si las comparamos con las plantas terrestres (Shabani y col., 2016).

La fijación de CO₂ lo hacen las algas unicelulares a través de la energía solar con una eficacia diez veces mayor que las plantas terrestres. La producción de microalgas tiene ventajas tales como: (i) es un método sosteniblemente ambiental; (ii) utiliza directamente la energía solar; y (iii) permite la coproducción de materiales de alto valor añadido basado en la biomasa (Pires, 2012).

Las microalgas se consideran los primeros organismos vivos que aparecieron en la tierra, y fueron las responsables de absorber el CO₂ atmosférico y transformarlo en oxígeno. Hoy en día hay miles de algas unicelulares que conviven en perfecta armonía con otros seres bióticos, y en la actualidad se está empezando a considerar su potencialidad para diversos usos. Las microalgas constituyen una prometedora opción de biomasa que puede ser usada como suplemento animal, producción de biocombustibles, y separación de componentes tanto para alimentación humana o usos específicos en la industria.

En este sentido, el uso de algas unicelulares representa un interés muy prometedor como fuente para la producción de carbohidratos, lípidos, proteínas, pigmentos, vitaminas y otros productos químicos de valor

agregado. Estos organismos tienen una tasa de crecimiento rápida y una alta productividad de lípidos (Lu y col., 2020). Si bien es cierto hay muchos escollos todavía por salvar en la producción de las microalgas que los hace nada competitivos con los productos producidos a partir de combustibles fósiles, es una de las alternativas que en la actualidad tiene avances muy significativos (Mantzorou y col. 2019).

La demanda mundial de alimentos provenientes de macro y microalgas está creciendo. La *Chlorella* y *Spirulina* se comercializan ampliamente en tiendas naturistas y ganan cada vez más popularidad por sus contenidos nutricionales. Según el informe de mercado de CredenceResearch (2020) se prevé que los productos de algas alcancen los 56,500 millones de dólares estadounidenses en 2027. Con la tendencia creciente de usos de productos sostenibles en todo el mundo, las algas ofrecen un gran potencial a largo plazo.

Una de las posibles aplicaciones del uso de CO₂ es la producción de microalgas que biosinteticen compuestos para la fabricación de biocombustibles, sin embargo, según Khoo y col. (2019) el principal desafío que presenta esta opción es el alto costo de producción por lo que sigue siendo un reto de investigación importante en cómo disminuirlos. Los trabajos de investigación y puesta en marcha de plantas piloto en un futuro cercano permitirán disminuir los costos de producción y ser competitivo con el resto de tecnologías.

Una de sus grandes ventajas para su producción es que requiere principalmente para su cultivo de agua y CO₂, disponibles a costos muy reducidos, de esta manera no generan competencia por el uso de suelos fértiles para su cultivo (Chew y col., 2017). Leu & Boussiba (2014) indican que las microalgas ofrecen la oportunidad única de utilizar terrenos improductivos y usar agua no potable, lo que le da una ventaja competitiva con otros cultivos.

Bajo la consideración de que las algas necesitan del CO₂ como fuente de carbono y sobre la base de la composición química media de la biomasa de algas, se requiere alrededor de 1,8 toneladas de CO₂ para producir 1 tonelada de biomasa. Si solo se inyectase aire atmosférico (contiene alrededor de 0.0383 % de CO₂) se requeriría

aproximadamente 37.000 m³ de aire para producir una tonelada de algas secas (FAO, 2009). Por lo que el uso de CO₂ en la producción de microalgas es fundamental y se presenta como alternativa para capturar los gases emitidos por las industrias. En la actualidad los estudios dan cuenta de que la implementación de biorefinerías deberían montarse cercanas a los sitios de generación de gases de combustión (por ejemplo, centrales eléctricas y refinerías). Cabe indicar que dichos gases de combustión podrían afectar al crecimiento de las algas, pues no están formados tan solo de CO₂ sino de óxidos, dióxido de azufre y nitrógeno, además que su uso mediante burbujeo nos puede llevar a contener bajos niveles de CO₂ disuelto en el agua (Moreira & Pires, 2016).

En los últimos años se han desarrollado trabajos de investigación relacionados con la captura de gases de combustión directamente de las industrias. El trabajo realizado por Yadav y col. (2016) permitió establecer una reducción en la salida de los gases de combustión al ambiente luego de que entró por el sistema implementado y un incremento en el rendimiento de microalgas. Por todo lo dicho el secuestro de CO₂ mediante microalgas se considera una forma prometedora, que puede fijar el CO₂ y producir simultáneamente bioproductos valiosos (Yu y col., 2020).

El consumo de fertilizantes y bioestimulantes se ha incrementado notoriamente como forma de aumento de la producción de cultivos. Sin embargo, el empleo de fertilizantes es una práctica cada vez más costosa que conlleva la contaminación del medio ambiente si la dosis aplicada no es la adecuada. Los biofertilizantes y bioestimulantes producidos en zonas próximas a la explotación son una alternativa viable y sostenible, ya que, evitarían el elevado coste asociado al transporte de los fertilizantes comerciales, con un gran impacto en la emisión de gases de efecto invernadero.

De esta manera, el uso de microalgas vivas en el desarrollo de las plantas constituye una alternativa novedosa para el uso como bioestimulantes en las diferentes etapas de crecimiento de los cultivos. Su efecto en las plantas está siendo estudiado, pues concentraciones

bajas de microalgas inciden en la activación de su metabolismo vegetal (Hernández-Herreray col., 2014; Garcia-González y Sommerfeld, 2016; Karthik y col., 2020; Shamia y col., 2020; Supraja y col., 2020).

Su papel benéfico está asociado a la mejora de la productividad de los cultivos (por ejemplo, en los arrosales) en donde se puede ver una reducción de la pérdida de suelo durante la temporada de lluvias, movilizan formas insolubles de fosfatos inorgánicos, pueden recuperar suelos sódicos, secretan exopolisacáridos y sustancias bioactivas lo que genera un incremento de rendimiento en los cultivos (Chatterjee y col, 2017).

Teniendo en cuenta estas consideraciones las microalgas en sistemas hidropónicos pueden desarrollarse en forma simbiótica con los cultivos, de esta manera tienen una influencia positiva como bioestimulantes.

Frente a todas las tecnologías utilizadas para la producción de las microalgas se encuentran los fotobiorreactores laminares. Este sistema permite absorber gases de combustión con alto contenido de CO₂ y está basado en la recirculación continua de un medio líquido que contiene microalgas a través de láminas de tejidos que facilitan su absorción. El sistema permite alta eficiencia lumínica y fácil intercambio de CO₂ desde los gases de emisión al cultivo y es aplicable a gran escala y con bajo coste.

El uso de nuevas tecnologías que permitan incrementar el rendimiento de masa microalgal es fundamental, de ahí que su aplicación en la presente tesis permitiría potencien su rendimiento, que se acople a sistemas de captura de gases de combustión y que su cosecha sea fácil. La evaluación de su potencial productivo bajo la influencia de gases de combustión mediante el uso del sistema laminar (Patente ES 2 347 515 A1) permitirá potenciar el desarrollo de las microalgas y generar un valor añadido. El uso del bioestimulantes a partir de esta materia prima ayudará a disminuir el uso de fertilizantes químicos y a potenciar los rendimientos en los cultivos.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue optimizar la patente de un fotobiorreactor para el crecimiento de microalgas a las condiciones y materiales presentes en Ecuador con el fin de escalarlo para su uso industrial, así como la aplicación de las microalgas en las distintas fases del ciclo de desarrollo de la lechuga.

Este objetivo se basa en las siguientes hipótesis:

- 1.- La optimización de la producción de microalgas en fotobiorreactores de la patente ES2347515A1 y el entorno de producción incrementará la producción de microalgas y disminuirá sus costes de producción
- 2.- Los principales factores a optimizar en la patente serán el material que permite la adhesión de las microalgas y el tiempo de apagado/encendido del circuito desde una perspectiva de la infraestructura.
- 3.- Desde una perspectiva del cultivo de la microalga en las unidades fotobiorreactoras, es el CO₂ como fuente de carbono para proceso fotosintético y el contenido en N en el medio de cultivo los principales factores a considerar.
- 4.- Las microalgas producidas en unidades fotobiorreactoras pueden emplearse como bioestimulantes en sistemas de cultivo hidropónico.

Los objetivos específicos fueron:

1. Desarrollar un prototipo industrial del modelo de patente ES2347515A1 mediante el empleo de materiales fácilmente disponibles en Ecuador.
2. Determinar distintos materiales textiles en los que se adhiere *Scenedesmus* sp y diferentes tiempos de conexión de la recirculación de la solución nutritiva con el fin de optimizar la producción y difusión de gases por toda la unidad fotobiorreactora.

3. Evaluar el crecimiento de *Scenedesmus* sp con distintas dosis de nutrientes y con diferentes concentraciones de CO₂ en unidades fotobiorreactoras simulando condiciones de dimensionamiento para la producción a gran escala.
4. Estudiar el efecto de la adición *Scenedesmus* sp como bioestimulante en las diferentes etapas del ciclo de producción en lechuga: germinación, plántulas y cultivo hidropónico.



RESULTADOS

Capítulo 1. DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE UNIDADES FOTOBIORREACTORAS PARA LA PRODUCCIÓN DE MICROALGAS

Resumen

En la actualidad existe mucha información relacionada con la puesta en marcha de unidades de producción de algas unicelulares a nivel de laboratorio. Sin embargo, es necesario desarrollar prototipos a escala piloto para facilitar su dimensionamiento a nivel industrial. Entre los diferentes sistemas de crecimiento de microalgas a nivel industrial se encuentran los fotobiorreactores laminares que permiten incrementar la producción de microalgas y pasar de una escala de laboratorio a un prototipo piloto que permitan obtener grandes volúmenes de producción microalgal minimizando los costes de producción.

La patente con número de publicación ES2347515A1 de la Universidad Politécnica de Madrid registrada en la Oficina Española de Patentes y Marcas consiste en un fotobiorreactor laminar para producción de microalgas por donde circula gases de combustión. Esta patente tiene la ventaja de que es modular lo que permite que pueda implementarse en módulos continuos.

El objetivo de este capítulo es adaptar un prototipo piloto a escala industrial con base en la patente ES2347515A1. La modificación de la patente consistió en el desarrollo de una infraestructura externa

(invernadero) que permite unas condiciones homogéneas para el crecimiento microalgal en los fotobiorreactores de tipo modular.

Para poner en marcha las unidades fotobiorreactoras en módulos continuos se instaló un invernadero de 30 m², con 16 paneles verticales de tipo laminar, que permitía la protección de las unidades fotobiorreactoras de los factores ambientales y la regulación de la temperatura. Los gases de combustión provienen de un generador eléctrico a diésel, éstos son enfriados, para posteriormente ser almacenados en una manga estanca sintética. Un compresor extrae los gases de combustión de dicha manga logrando que la concentración de CO₂ llegue a un promedio de 4572 ppm, un regulador de gases los direcciona a una carcasa en donde se mezcla con aire generado por una turbina. Posteriormente esta mezcla se distribuye a los paneles por cuatro entradas logrando mantener una cámara homogénea interna de gases. Estos gases constituyen la fuente de CO₂ para el desarrollo microalgal.

La circulación del medio de cultivo en fase líquida en el sistema de paneles se logra con una bomba sumergida en un reservorio (18 L min⁻¹), la solución nutritiva se distribuye a la lámina de los paneles homogéneamente por medio de un canal distribuidor con perforaciones. La fina capa de solución nutritiva que se forma se logra porque antes del encendido de la bomba se humedece la lámina textil y pasa por una lámina plástica que distribuye en forma homogénea.

Los paneles verticales se construyeron con poliestireno expandible (espesor 70 mm) con dimensiones de 1,3 m de alto por 0,9 m de ancho, con cuatro cavidades en donde se inyecta los gases de combustión. Como lámina soporte se utiliza polietileno de alta densidad (sarán) y sobre ésta se coloca la lámina textil. Se unieron 4 unidades fotobiorreactoras en línea para optimizar el espacio al interior del invernadero, estableciéndose 4 líneas con una distancia de pasillos de 1 m. Para la cosecha de microalgas se realiza un raspado en la lámina tras apagado de la bomba de recirculación con lo que se logra obtener microalgas concentradas.

Palabras clave: algas unicelulares, sistema laminar, paneles verticales.

Abstract

Currently there is a lot of information related to the start-up of unicellular algae production units at the laboratory level. However, it is necessary to develop prototypes on a pilot scale to facilitate their industrial dimensioning. Among the different systems for growing microalgae at an industrial level are laminar photobioreactors that allow increasing the production of microalgae and going from a laboratory scale to a pilot prototype that allow obtaining large volumes of microalgal production while minimizing production costs.

The patent with publication number ES2347515A1 from the Polytechnic University of Madrid registered in the Spanish Patent and Trademark Office consists of a laminar photobioreactor for the production of microalgae through which combustion gases circulate. This patent has the advantage that it is modular which allows it to be implemented in continuous modules.

The objective of this chapter is to adapt a pilot prototype on an industrial scale based on patent ES2347515A1. The modification of the patent consisted in the development of an external infrastructure (greenhouse) that allows homogeneous conditions for microalgal growth in modular photobioreactors.

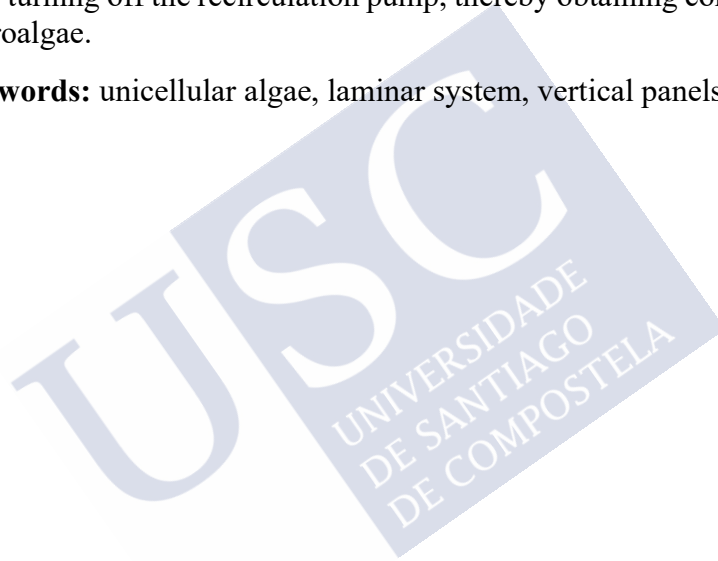
To start up the photobioreactor units in continuous modules, a 30 m² greenhouse was installed, with 16 vertical panels of the laminar type, which allowed the protection of the photobioreactor units from environmental factors and the regulation of temperature. The combustion gases come from a diesel electric generator, these are cooled, to later be stored in a synthetic watertight sleeve. A compressor extracts the combustion gases from said sleeve, making the CO₂ concentration reach an average of 4572 ppm, a gas regulator directs them to a housing where it mixes with air generated by a turbine. Subsequently, this mixture is distributed to the panels through four inlets, managing to maintain a homogeneous internal chamber of gases. These gases constitute the source of CO₂ for microalgal development.

The circulation of the culture medium in liquid phase in the panel system is achieved with a pump submerged in a reservoir (18 L min⁻¹),

the nutrient solution is distributed to the panel sheet homogeneously through a distribution channel with perforations. The thin layer of nutrient solution that is formed is achieved because, before the pump is turned on, the textile sheet is moistened and passes through a plastic sheet that is evenly distributed.

The vertical panels were built with expandable polystyrene (thickness 70 mm) with dimensions of 1.3 m high by 0.9 m wide, with four cavities where the combustion gases are injected. High-density polyethylene (saran) is used as a support sheet and the textile sheet is placed on it. 4 photobioreactor units were joined in line to optimize the space inside the greenhouse, establishing 4 lines with a distance of corridors of 1 m. For the harvesting of microalgae, a scraping is carried out on the sheet after turning off the recirculation pump, thereby obtaining concentrated microalgae.

Keywords: unicellular algae, laminar system, vertical panels.



1.1 Introducción

El cambio climático es una realidad que está provocando grandes pérdidas económicas a nivel global y cuyas causas y efectos deben contrarrestarse a través de todos los medios posibles (IPCC, 2019). La principal causa del cambio climático es la emisión de gases a la atmósfera como el dióxido de carbono (Pires, 2019), el óxido nitroso y el metano. El empleo del dióxido de carbono como fuente de C en el proceso fotosintético presenta dos grandes ventajas, por una parte, la reducción de las emisiones, y por otra la conversión de este gas en biomasa que puede ser empleada como fuente de energía alternativa al uso de las no renovables. De igual forma el nitrógeno del óxido nitroso puede ser empleado como fuente alternativa de N para el desarrollo de cultivos unicelulares, pues las microalgas pueden tolerar altas concentraciones de NO_x hasta 300 ppm (Kumar y col, 2010). Las grandes emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera en los procesos industriales podrían minimizar su impacto mediante la fijación del carbono emitido en cultivos de microalgas. Estas microalgas tienen múltiples usos como su empleo en cosmética o nutrición que se asocia a los conceptos de la economía circular y bioeconomía que a la vez que el empleo de un recurso que de otra forma sería un residuo (Syrpas y Rimantas, 2020).

El empleo industrial de microalgas como sumidero de CO_2 es de gran interés, ya que posee la capacidad de fijar entre 10 y 50 veces más CO_2 que las plantas terrestres (Way y col, 2015), resultando por lo tanto más eficiente. Cheng y col (2013) destacan que el uso de microalgas tiene la ventaja de ser un método ambientalmente sostenible que además de emplear las microalgas para reducir los niveles de gases a la atmósfera también se pueden utilizar para reducir la capacidad contaminante de otros residuos como es el caso de las aguas residuales urbanas o industriales de los que se pueden obtener co-productos de alto valor agregado.

Un importante problema en la producción de microalgas a gran escala son las técnicas de recolección de la biomasa una vez producidas (Mantzorou & Ververidis, 2019). Debido a su rápido crecimiento se recomienda una recolección continua, de lo contrario el proceso de

fotosíntesis se vería negativamente afectado (Garbowski, Jolanta , Pulikowski , & Wiercik , 2017). Si se considera que el mayor gasto de producción está en la recolección es necesario buscar un sistema que disminuya estos costes, ya que la recolección puede representar el 30% del gasto total del cultivo de microalgas (Seung y col., 2014).

En este contexto, los desafíos son muy amplios, ya que el objetivo es obtener productos de alta calidad y valor añadido con sistemas de producción de microalgas que sean eficientes y de bajo coste. Una forma de reducir costes es a través de la potenciación de aspectos relacionados con la bioeconomía y la economía circular (European Commission, 2018). En el marco de estas dos estrategias de reciente y elevada importancia para la Unión Europea existe en la actualidad el fomento del aprovechamiento de los residuos generados en cualquier proceso productivo, aspecto ya promovido en la Agenda 21, que desarrolló una línea en este sentido, cuando se definió el concepto de sostenibilidad (Naciones Unidas, s.f.). Un ejemplo es el empleo de los gases de combustión (ejemplo CO₂) de procesos industriales como fuente de carbono para incrementar la producción de microalgas. Estos gases además de no ser emitidos a la atmósfera, pueden ser transformados en glucosa a través de los procesos fotosintéticos, que pueden reemplazar el empleo de energías no renovables en procesos energéticos. Los gases de combustión están entre principales responsables del efecto invernadero que se genera a la atmósfera que está provocando un aumento de la temperatura de la tierra. D'Imporzano y col. (2018) mencionan que crear valor a partir de residuos y subproductos resulta una opción interesante para hacer uso de fuentes de carbono de bajo coste desde un enfoque mixotrófico. Los mismos autores realizaron una simulación del ciclo de vida en *Chlorella vulgaris* y determinaron que el cultivo de microalgas a partir de nitrógeno y carbono recuperados en procesos de combustión industrial reduce las emisiones de CO₂ en casi un 60%, aspectos muy relevantes para minimizar el impacto en la atmósfera de estos gases.

Para que la producción de algas unicelulares sea rentable se requiere que el sistema de producción sea eficiente a la hora de producir biomasa lo que se consigue maximizando la iluminación necesaria para la

fotosíntesis, un suministro continuo de CO₂ durante la fase fotosintética de las microalgas, una disminución de oxígeno que no reduzca la capacidad fotosintética, suministro de los nutrientes necesarios a través de una composición adecuada del medio de cultivo y que todo el proceso se desarrolle en unas condiciones óptimas de temperatura, humedad y radiación (Universidad Politécnica de Madrid, 2010). Todos estos aspectos se han evaluado en el diseño de un prototipo funcional con base en la patente ES2347515A1. Esta patente plantea la producción de biomasa microalgal en un fotobiorreactor laminar para aplicarlo en un proceso industrial donde las condiciones de iluminación y suministro de CO₂ son óptimas dando lugar a una elevada productividad con bajos costes de inversión y mantenimiento.

La producción masiva de microalgas requiere de sistemas que permitan concentrar las algas unicelulares y disminuir los costes para su extracción. Los métodos existentes (sistemas abiertos) en la actualidad se pueden considerar como adaptables y de fácil desarrollo, pero no permiten obtener una elevada producción.

El objetivo principal de este trabajo fue adaptar, implementar y optimizar un prototipo industrial del modelo de patente ES2347515A1 mediante el empleo de materiales fácilmente disponibles en Ecuador con el fin de desarrollar un sistema de fotobiorreactores laminares de microalgas a escala piloto que permita su desarrollo a nivel industrial.

1.2 Material y métodos

La patente objeto de estudio fue “Fotobiorreactor laminar para la producción de microalgas” del inventor Jesús Fernández González, solicitud presentada por la Universidad Politécnica de Madrid a la Oficina Española de Patentes y Marcas, con fecha de concesión de patente del 10 de mayo del 2011 (ES 2347515A1).

Se adoptó el uso de la invención propuesta por tener marcadas ventajas frente a los sistemas tradicionales de producción de microalgas y sobre todo porque este sistema es multipropósito permite usar gases de combustión como fuente de alimentos de microalgas y puede ser

aplicable a gran escala con la consiguiente disminución de costes frente a otros sistemas.

Según se describe en la patente el fotobiorreactor laminar tiene aplicación en la producción de biomasa de microalgas y sus funciones pueden ser sumidero de gases efecto invernadero (CO₂ y óxidos de nitrógeno) de industrias generadoras. El fotobiorreactor patentado se basa en la recirculación de un medio líquido sobre láminas de tejidos, y éstas colocadas en un panel cuyo interior es hueco y es en donde se inyectan los gases de combustión. El medio de cultivo desciende lentamente por la lámina y se recoge en un canal y de este va a un depósito que luego lo recircula a través de una bomba.

El fotobiorreactor de la invención puede utilizar varias modalidades de funcionamiento. Para la presente investigación se consideró usar el sistema mixto de poblaciones heterogéneas de microalgas (algas inmobilizadas y en movimiento por el medio de cultivo). Este sistema utiliza como procedimiento de recolección la suspensión del sistema de recirculación y la posterior cosecha de las algas inmobilizadas.

La unidad fotobiorreactora de la que tratamos en todos los capítulos de la tesis doctoral se define por un panel que se encuentra formado por una estructura en poliestireno expandido sustentado por un soporte metálico y además todo el panel está cubierto por un material textil que forma la lámina donde se adhieren las microalgas. El conjunto de unidades fotobiorreactoras forman el sistema de fotobiorreactores.

1.3 Resultados y discusión

En el presente apartado se describe la implementación de la patente en un sistema piloto usando materiales de fácil acceso en Ecuador y que permitan posteriormente escalarlo de acuerdo a las necesidades de una planta industrial que genere gases de combustión para su valorización.

En el ejemplo que se presenta en la patente se unieron tres unidades fotobiorreactoras constituidas por un canal de recolección único. De la misma manera existía una conducción única de gases de combustión y

de medio de cultivo que a través de líneas secundarias se distribuía a cada unidad.

Bajo la consideración de la construcción en paralelo se implementó un sistema de unidades fotobiorreactoras dentro de un invernadero, pero con la implementación de que desde el tanque colector de gases implementado permite ajustar la concentración de los mismos para ser distribuido por 4 accesos secundarios a cada unidad.

En la tabla 1 se indican las adaptaciones realizadas sobre la patente ES 2347515A1.



Tabla 1. Adecuaciones a la patente

Característica	Patente ES2347515A1	Adecuaciones a la patente
Número de unidades fotobiorreactoras	Fotobiorreactor que funciona en paralelo, en la patente se explica el diseño con 3 unidades.	Fotobiorreactor constituido por 16 unidades, que optimiza el espacio dentro de un invernadero.
Distribución de gases de combustión a las unidades fotobiorreactoras.	Hay una toma de gases de combustión para cada unidad fotobiorreactora.	Presenta 4 tomas de gases de combustión para cada unidad fotobiorreactora, logrando cubrir el espacio producido por cada subpanel.
Conducción de la solución nutritiva.	El medio de cultivo se distribuye a través de una bomba y de una tubería general.	Existe una bomba de conducción individual por unidad fotobiorreactora, lo que permite un control independiente.
Distribución de la solución nutritiva	Tubería perforada o acanalada.	Tubería perforada que cae sobre un canal perforado logrando una distribución homogénea del medio de cultivo sobre la lámina textil.
Dispersión del medio de cultivo sobre la lámina textil	El medio de cultivo pasa por la tubería perforada y se distribuye en forma directa sobre la lámina textil	El medio de cultivo se hace pasar a través de una barrera de una lámina plástica ubicada en la parte superior lo que facilita la distribución homogénea por toda la unidad fotobiorreactora.
Estructura del panel de la unidad fotobiorreactor	Utiliza material en PVC para hacer el marco de la unidad	Se utiliza una plancha de poliestireno expandido de 7 cm de espesor de fácil construcción.
Generación de cámara interna de gases	Existe una sola cavidad interna en cada unidad fotobiorreactora	Las cavidades formadas por el corte de la espuma flex (subpaneles) permite que los espacios interiores formen una cámara interna de gases de combustión
Características de la tubería de suministro de gases de combustión	Tubería porosa ubicado en la parte baja de la única cavidad creada en la unidad fotobiorreactora	Tubería flexible plástica ubicada en la parte baja de cada subpanel de la unidad fotobiorreactora.
Malla soporte	Lámina de malla ligera tipo mosquitera que cubre ambos lados del bastidor	Malla tipo zarán que cubre ambos lados del bastidor de fácil acceso.
Sujeción de la malla soporte	Lámina mosquitera pegada	Lámina sujeta por sus extremos con hilo sintético.
Almacenamiento de los gases de combustión	No explica el sistema	Sistema de generación de gases de combustión, enfriamiento, almacenamiento y compresión.
Regulación de la mezcla de gases y aire	No se explica en la patente	Sistema que permite realizar una mezcla de gases con aire para inyección a las unidades fotobiorreactoras de acuerdo a las necesidades de CO ₂ .
Ubicación de las unidades fotobiorreactoras	No explica en la patente	Invernadero que permite proteger las unidades fotobiorreactoras de los factores ambientales y mantener controlada la temperatura en el interior.

En los apartados siguientes se describen aquellos aspectos más relevantes de la modificación y adaptación de la patente.

1.3.1 Características de la estructura externa tipo invernadero para la instalación de las unidades fotobiorreactoras.

La patente no detalla aspectos de distribución de las unidades fotobiorreactoras dentro de un espacio aislado del medio ambiente. Debido a esto se propuso la implementación de un módulo de acogida del biorreactor tipo invernadero en donde puedan alojarse las unidades de microalgas. La razón obedece a que se requiere mantener un sistema aislado del medio externo con el fin de evitar contaminación por distintos organismos y permitiría mantener condiciones climáticas estables, evitando la alteración a la que se verían sometidos los paneles por los agentes meteorológicos.

El diseño del invernadero se realizó con el fin de colocar en él 16 unidades fotobiorreactoras, las dimensiones establecidas permitieron colocar 4 líneas con 4 unidades fotobiorreactoras cada una.

El invernadero se construyó en estructura metálica, con paredes y techado de policarbonato transparente con un espesor de 12 mm. La dimensión del invernadero fue de 6 m de largo por 5 m de ancho, y 4 m de altura con un área total de 30 m² y una superficie interior neta de 28,18 m² (Figura 1). En la parte superior del invernadero existe una ventana cenital de 0,3 m con orientación en sentido norte-sur (Figura 2) que permite la salida de aire caliente. En los laterales del invernadero se colocaron ventanas para permitir la circulación de aire, cuando fuese necesario. Se instalaron 4 ventiladores en el interior del invernadero, éstos se encienden en forma automática una vez que la temperatura del invernadero llega a los 30°C a través de un sensor acoplado en el mismo ventilador (Figura 3). El control de la temperatura es un requisito necesario ya que la temperatura óptima de las microalgas mesófilas se encuentra entre 20°C a 25°C con lo cual se logra mantener crecimientos máximos en base a este parámetro (Boelee y col., 2014). Por otra parte, en estudios realizados en fotobiorreactores, la temperatura óptima del

medio de crecimiento de las algas se encuentra entre 25 y 30°C (Shenawy y col., 2020). La implementación de una cubierta externa permite mantener temperaturas estables ya que es un factor que puede afectar a las tasas de crecimiento de microalgas (Kesaano & Sims, 2014) y al ser los fotobiorreactores particularmente vulnerables a los cambios de temperatura, un aumento de este parámetro puede ir ligado a pérdidas de agua por evaporación.



Figura 1. Vista exterior de invernadero en donde se colocaron las 16 unidades de láminas verticales para el desarrollo de ensayos de producción de algas unicelulares. (V= Ventana; VC= Ventana Cenital; UF=Unidades Fotobiorreactoras; VT= Ventiladores)



Figura 2. En el invernadero se aprecia en la parte superior mediante flechas una apertura (ventana cenital) para salida de aire caliente y evitar excesos de temperatura

Las biopelículas de microalgas dependen en gran medida de la cantidad de radiación o luz que reciben ya que es la principal fuente de energía para que tenga lugar el proceso fotosintético y un factor clave para la optimización de su crecimiento (Zippel y Neu, 2005). El invernadero construido aporta y permite cierta estabilidad de las condiciones de temperatura, radiación y humedad que precisa el cultivo de microalgas en los biorreactores.



Figura 3. Vista de uno de los cuatro ventiladores instalados en el invernadero

1.3.2 Sistema de almacenamiento de gases de combustión

Con el fin de lograr un dimensionamiento a nivel piloto y que en lo posterior sea fácilmente instalado en una industria generadora de gases de combustión se consideró muy importante la implementación de un sistema que permita almacenar y distribuir los gases de combustión, ya que la patente no considera la puesta en marcha de un sistema de varios módulos independientes que permitan ser activados o desactivados en función de las necesidades de la industria. Teniendo en cuenta que puede haber emisiones industriales intermitentes y en vista de la necesidad de mantener un flujo constante de CO₂ en el sistema laminar es necesario un centro de almacenamiento. Además, los gases de combustión en concentraciones no óptimas pueden afectar negativamente el desarrollo microalgal y al ser un espacio experimental se requería mantener la estabilidad de la composición de gases a través del control de la concentración de CO₂ inyectados al sistema.

Con el fin de inyectar gases de combustión (principalmente CO₂) a cada uno de los biorreactores se diseñó un sistema que consta de un generador, tanque de enfriamiento, contenedor de almacenamiento, compresor y tuberías para inyectar gases de combustión a los paneles de microalgas (Figura 4).

Sus características son las siguientes:

1. En el prototipo la generación de gases de combustión se realizó con un generador eléctrico diésel (2D66000CL diésel, marca Deluxe). La salida del tubo de escape del generador fue de 1 ¼" (40 mm), a este tubo de salida se acopló una manguera sintética de polietileno de 19 mm.

2. El tanque de enfriamiento tiene una capacidad de 100 litros y cumple la función de disminuir la temperatura de los gases de combustión, de esta manera se pueden fácilmente almacenar temporalmente sin provocar daños a la manga plástica instalada al disminuirse el potencial energético y el volumen de los mismos.

3. Desde este tanque de enfriamiento los gases se conducen por una tubería de diámetro de 16 mm hacia un contenedor de almacenamiento de un volumen de 3 m³ (Largo: 15 m, Diámetro: 0,5

m). A la salida del contenedor de almacenamiento se acopló una tubería de diámetro de 16 mm que se conecta directamente a un compresor.

4. El compresor cuando se enciende absorbe por un lado los gases de combustión almacenados en el contenedor de almacenamiento a través de uno de los orificios de ingreso (cuenta con dos entradas de aire) y por otro orificio absorbe aire del ambiente. De tal manera que en el compresor se almacena una mezcla de gases para el crecimiento microalgal, lo que permite disminuir la concentración de gases que se inyectarán en el fotobiorreactor. El compresor presenta una capacidad de 60 litros, posee una potencia máxima de 4HP/2,985 W y una potencia nominal de 3 HP/2,200 W con un arranque automático y con banda lubricada (Marca Truper®).

5. Una vez almacenados los gases de combustión en el compresor, éstos salen gradualmente de acuerdo a las necesidades de los ensayos que se establecieron. Para regular la salida de gases de combustión se acopló una válvula de revisión de salida de gases.



Figura 4. Sistema de generación, almacenamiento y mezclado de gases de combustión. 1. Generador de gases, 2. Tanque de enfriamiento, 3. Almacenamiento de gases, 4. Entrada de gases y aire, 5. Compresor.

En el contenedor de almacenamiento se mantienen concentraciones superiores a 5000 ppm de CO₂. En el compresor se mantienen valores medios de 4572 ppm de CO₂.

El funcionamiento del sistema de generación de gases y de suministro a los paneles se realiza a través de un sistema automatizado de encendido y apagado de las bombas de recirculación, permitiendo además programar tiempos de accionamiento. Cuenta con 16 interruptores de pulso (uno para cada unidad fotobiorreactora) con un controlador Schneider Imput 100-240 VAC SR3XT14IFU.

Además, se instalaron dos temporizadores para el encendido y apagado del sistema fotobiorreactor, uno de ellos enciende el compresor a las 6h00 y se apaga a las 17h00 y otro temporizador que enciende la turbina de aire a las 7h00 y apaga a las 18h00, que en el caso del Ecuador se mantiene estable a lo largo del año, ya que la hora del amanecer y el anochecer sufre muy pequeñas variaciones a lo largo del año, si bien podría el sistema diseñado permitir un ajuste en zonas ubicadas en mayores latitudes. El accionamiento del compresor se realiza una hora antes para garantizar que se llene con gases de combustión en una concentración determinada. Posteriormente tras una hora de encendido el temporizador se acciona la turbina y envía aire a presión para ser mezclado con los gases de combustión en el compresor. Al finalizar el día se apaga el compresor de forma automática, pero continúa funcionando la turbina, este procedimiento se realiza porque en el compresor existen gases que requieren de una hora para descargarse. Desde las 18h00 hasta las 6h00 del siguiente día no se inyectan gases de combustión al sistema.

1.3.3 Sistema de distribución de los gases de combustión

Es de gran importancia en estos sistemas el proceso de almacenamiento y distribución de los gases de combustión. La patente en estudio indica una distribución directa y estable de los gases de combustión desde la fuente de origen hacia la unidad fotobiorreactora donde se cultivan las microalgas. Se considera fundamental establecer un sistema para lograr que los gases lleguen con los requerimientos

necesarios y continuos a todos los puntos del panel de las unidades fotobiorreactoras.

Los gases de combustión almacenados en el compresor se envían a través de una tubería de 16 mm a un tubo PVC de 370 mm de largo y diámetro de 100 mm (denominada cámara de mezcla), tal y como se describe en la Figura 5. El ingreso de los gases de combustión se hace por la parte baja y central de la cámara de mezcla (a unos 18,5 cm de sus extremos). A un lado de este tubo hay una turbina con una entrada de 300 L min^{-1} a través de la cual ingresa aire del ambiente en la carcasa donde se mezclan los gases con el fin de, por un lado, disminuir la concentración de CO_2 en la mezcla gaseosa, y por otro, que permita la llegada de la mezcla de gases a las cámaras internas de los paneles verticales. Por el otro extremo de la cámara de mezcla se instalaron 4 salidas, las cuales se distribuyeron a las líneas de conducción principal de la mezcla de gases hacia los paneles de producción de microalgas que se describirán posteriormente.

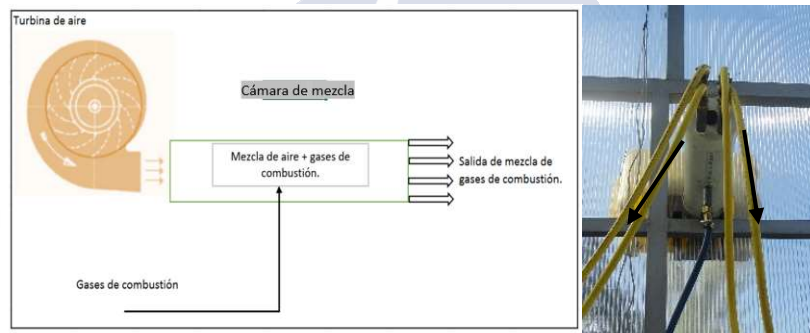


Figura 5. Mezcla de gases de combustión en la cámara de mezcla, de donde se distribuyen hacia las líneas de conducción principal de gases de combustión

De cada línea de conducción principal salen 16 sublíneas, cada una con una válvula plástica que regula la concentración de gases de combustión que llega a cada subpanel. De esta manera 4 sublíneas son utilizadas para cada unidad fotobiorreactora tal y como se aprecia en la Figura 6.

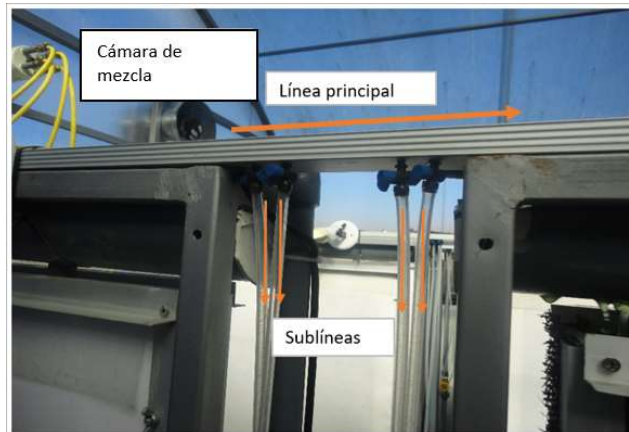


Figura 6. Distribución de la mezcla de gases de combustión desde la línea principal a las sublíneas.

Considerando los datos anteriores, entonces se instalaron 4 líneas de conducción principales con 64 sublíneas de conducción secundaria. Cada sublínea se insertó en la parte inferior de cada subpanel. Para evitar la salida de gases de combustión a través de la unión creada en el panel se procedió a su sellado con silicona.

En la sublínea de conducción se realizó un corte y se acopló una unión, esto con el fin de que cuando se realicen las mediciones de CO_2 en cada uno de los paneles, simplemente se separa la unión de la manguera y se realiza la respectiva medida. Una vez realizada la medición, inmediatamente se cierra la entrada de este gas. Esta medición lleva muy poco tiempo, por lo que la pérdida de gases en la cámara es insignificante. Una vez colocada la unión en la manguera se retoma rápidamente el microambiente creado (Figura 7).

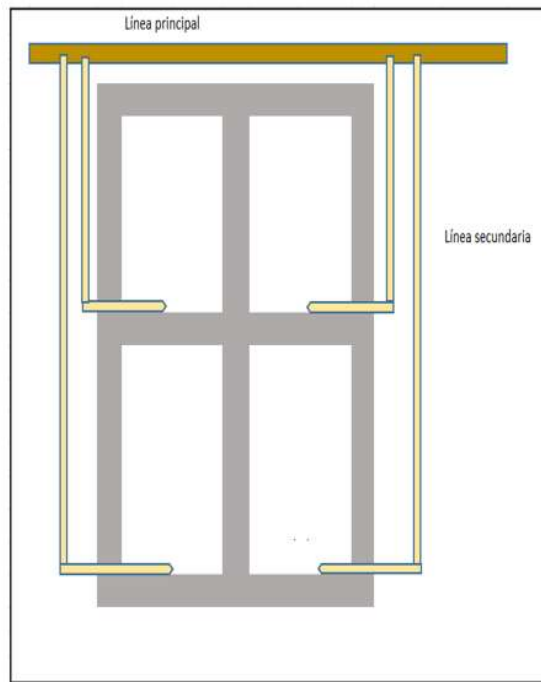


Figura 7. Esquema de conducción de líneas secundarias en cada uno de los subpaneles

Los gases de combustión se inyectan al sistema durante el día. Un controlador automático digital enciende el compresor y la turbina de aire a las 7h00, manteniéndose encendido el sistema por 12 horas, luego automáticamente desconecta estos equipos.

El funcionamiento integral del sistema de gases se puede observar en la Figura 8, en donde se aprecia la generación de gases y la distribución final a los subpaneles de cada unidad fotobiorreactora.

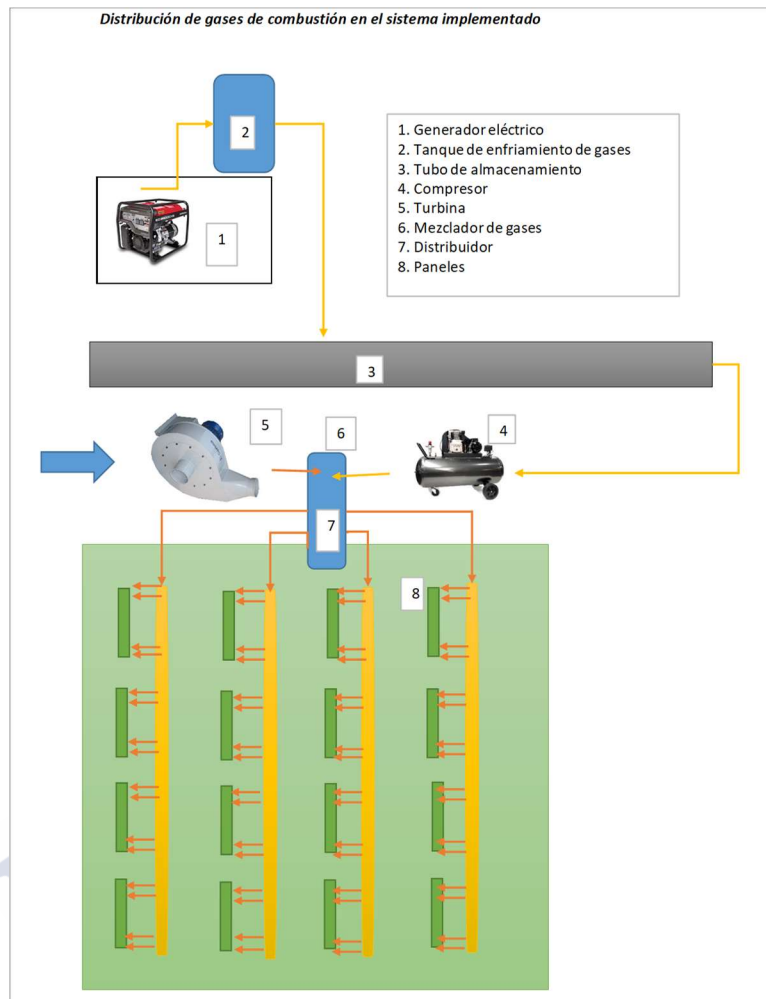


Figura 8. Sistema de distribución de gases de combustión en cada una de las unidades fotobiorreactoras

Los resultados mostraron un correcto funcionamiento del sistema empleado logrando una distribución homogénea de los gases de combustión por las cámaras creadas por el corte del poliestireno expandido. En el capítulo 2 se realizan ensayos de la concentración de gases de combustión en el interior de los subpaneles.

1.3.4 Sistema de recirculación de solución nutritiva

Cada unidad fotobiorreactora cuenta con un sistema de recirculación de solución nutritiva con el fin de mantener humedecida la lámina vertical y esto durante todo el ciclo de cultivo sin ninguna interrupción. Si se produjese esta interrupción de flujo de solución nutritiva, el agua contenida en las láminas se evaporaría en menos de 3 horas con la consecuente muerte de las algas unicelulares.

La solución nutritiva sale por una tubería situada en todo el recorrido del panel vertical (0,90 m) la cual tiene orificios cada 5 cm con el fin de lograr una distribución homogénea del agua en la lámina. De manera adicional a este sistema, justo bajo la salida del agua se instaló una canaleta fabricada con tubo PVC cortada longitudinalmente, la cual también tiene orificios en su parte inferior cada 5 cm. De esta manera se logra distribuir el agua homogéneamente y lentamente para evitar dañar la lámina y sobre todo las algas que en ella crecen (Figura 9).



Figura 9. Distribución homogénea de agua en la parte superior del panel vertical

Se estableció un circuito de flujo continuo controlado a través de un caudalímetro. El medidor de caudal de agua es H621-004-R Hedland. El flujo seleccionado permite que el caudal del agua no sea limitado (lo que provocaría espacios de la lámina sin humedecer), o muy elevado que provocaría un exceso de agua en la lámina y arrastre con su flujo de las microalgas y por lo tanto que se desprendiesen las láminas de microalgas creadas. La interrupción de flujo de la solución

nutritiva provoca una disminución de la producción de microalgas tal como se describe en el capítulo 2.

Así como menciona Choudhary y col. (2017) la formación de la biopelícula depende en gran medida del flujo de la fase líquida. La solución debe circular a una velocidad adecuada para aportar los nutrientes a los microorganismos. Teniendo en cuenta estas condiciones, se reguló un flujo de 5 L min^{-1} , considerándose idóneo para mantener un crecimiento microalgal en las paredes de la lámina.

Caudales superiores a este flujo determinado provocarían desprendimiento de las células y en consecuencia disminución del espesor de la biopelícula (Berner y col., 2015). Se pudo comprobar que en el sistema instalado niveles muy bajos de caudal provocan que ciertas áreas de la lámina no se humecten completamente provocando problemas de crecimiento de bacterias, de ahí la importancia de que el sistema se encuentre húmedo en toda el área de la biopelícula. En este sentido, Berner, y col., (2015) pudieron comprobar que las células al no tener una superficie húmeda no se adhieren en forma firme, aunque recomiendan mantener velocidades de flujo bajas al inicio de la producción para posteriormente irse incrementarlo a medida que se produce el crecimiento celular.

Para la regulación de la solución se utilizó una llave de paso en cada unidad fotobiorreactora con el fin de regular la solución. Para la circulación de la solución nutritiva se utilizó una bomba sumergible marca EVANS de 60 W modelo AQUA60W con potencia de motor 0,10 hp, 3450 rpm, monofásico de 120 V que provee un flujo de 18 litros por minuto a una altura máxima de 2,5 m. El diámetro de succión es de 1 pulgada y el diámetro de descarga es de 0,75 pulgadas. Se acopló una llave secundaria para regular el flujo de entrada a la lámina. Esta bomba se colocó en un tanque de plástico con una capacidad total de 25 litros desde donde se eleva a una altura de 2 m para iniciar con la recirculación.

Una vez que el sistema se acciona es necesario en primer lugar haber humedecido la lámina textil solo con agua de tal manera que el flujo de la solución nutritiva descienda lentamente durante todo su

recorrido. Ya en funcionamiento es necesario regular el flujo de la solución nutritiva con el fin de mantener una delgada lámina de solución nutritiva que recorra lentamente el panel pero que tampoco queden áreas sin humedecerse (Figura 10).

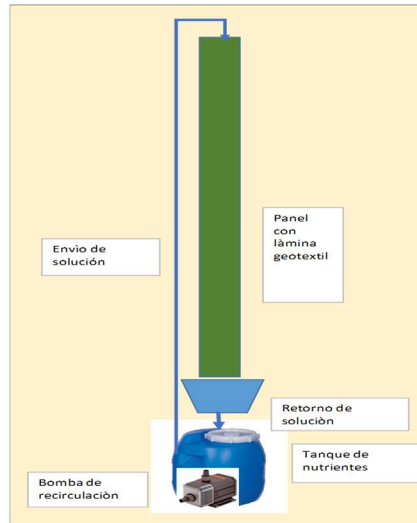


Figura 10. Sistema de recirculación de agua. La bomba sumergible envía el agua a la parte superior del panel, retornando ésta al tanque de reserva de agua.

Para que la humedad de la lámina sea la correcta y sobre todo permitir que el sistema humecte en forma homogénea en toda el área, se humedece la lámina con un aspersor que contiene agua e inmediatamente se enciende el sistema de bombeo. En la parte superior del panel vertical se colocó una lámina de material Pet de 500 micras junto a la lámina textil y sujeta con una placa de aluminio esto permite que el fluido se distribuya lentamente y en toda su extensión a lo largo del panel, en caso de existir interrupción de la energía eléctrica y por ende un apagado de la bomba, es necesario repetir este proceso, aunque todo dependerá del tiempo que la lámina textil permanece sin humedecerse. Este proceso se completa en alrededor de 5 minutos (Figura 11). Desde allí en adelante es necesario mantener durante todo el ciclo de cultivo encendidas las bombas de recirculación, puesto que

por una parte y tal y como se ha mencionado anteriormente la falta de humedad hace que las microalgas se mueran y otra cuando se reestablece el sistema puede existir una mala distribución del líquido debido a los residuos de las microalgas.



Figura 11. Proceso de humectación del material textil

Para disminuir la conductividad eléctrica del agua de la red se utilizó un desmineralizador acoplado a una bomba de agua para aumentar la presión en el sistema (marca Aquatec de 24 VAC y 50-60 Hz (Figura 12).



Figura 12. Desmineralizador de agua

1.3.5 Instalación de paneles verticales

La patente revisada mantiene dentro de su diseño una estructura en Policloruro de Vinilo (PVC) para cada unidad fotobiorreactora de tal manera que se forma una única cavidad en su interior. El material empleado en esta tesis consistió en el uso de una plancha de poliestireno expandido (panel) para cada unidad fotobiorreactora de un espesor de 70 mm. Las dimensiones de cada panel fueron de 1,30 m de alto por 0,9 m de ancho, siendo el área total de 1,17 m² (Figura 13). Cada panel se divide en cuatro sub paneles con dimensiones internas de 50 cm de alto por 29 cm de ancho, formando de esta manera una estructura soporte para la unidad fotobiorreactora.

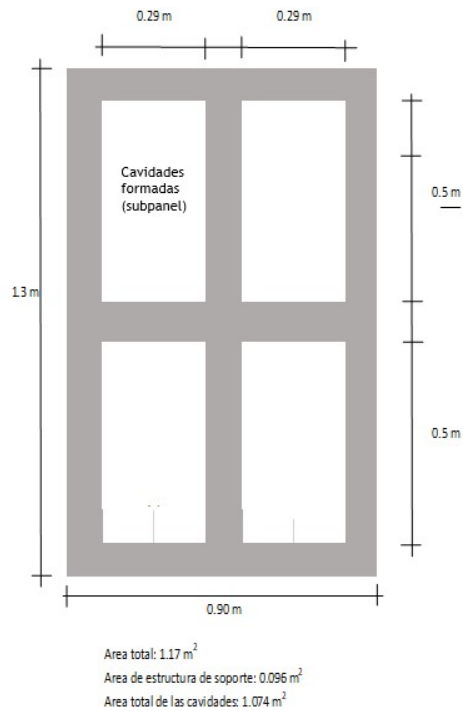


Figura 13. Dimensiones del panel y de las cuatro cavidades formadas (subpaneles)

Sobre el panel usado como estructura de soporte se colocó una lámina porosa de polietileno de alta densidad (tamaño de orificio de 3 x 2 mm con un peso por metro cuadrado de 55 g y una resistencia a la ruptura de 7,2 kg cm⁻²) que permitirá que el textil se adhiera fácilmente al panel vertical. La lámina textil se colocó en una sola extensión sin uniones haciendo coincidir la parte central de la misma en la parte superior del panel. Para dar rigidez al panel y sobre todo sujetar la lámina textil se utilizó como soporte una placa de aluminio que se colocó en toda su extensión (extremos verticales del panel) en la que se realizaron perforaciones y con tornillos se logró sujetar por los dos lados del panel; así entonces, la lámina textil gozó de estabilidad. Dos tubos de PVC de media pulgada atraviesan en forma vertical por el panel. Una vez armados los paneles se colocaron en un soporte

metálico, con una altura de 2 m, quedando de esta forma armada una unidad fotobiorreactora. Se dejó un espaciamiento entre éstas de 0,15 cm (Figura 14).



Figura 14. Soporte metálico en los paneles verticales que da lugar a la unidad fotobiorreactora

1.3.6 Cosecha

Si bien en la patente se explica que la cosecha se puede realizar de una manera más fácil en comparación con las unidades de sistemas abiertos, no se detalla el proceso a seguir. En este apartado describimos el procedimiento para llevar a cabo la cosecha de las algas en los paneles laminares.

Como indicador del momento apropiado para la realización de la cosecha se consideró el cambio color de la lámina textil, como puede observarse en la Figura 15.



Figura 15. Fase de producción de microalgas en los paneles verticales en donde se observa el color verde, indicativo de que las algas están desarrollándose.

La cosecha se realiza con una espátula de aluminio. Cabe indicar que previo a la cosecha de microalgas se suspende el flujo de agua en la lámina y tras pasar 30 segundos se inicia la cosecha. El procedimiento consiste en realizar un raspado en la lámina textil con esta espátula. Se colocan las microalgas en un recipiente de capacidad de 5 litros. La cosecha se inicia por la parte superior del panel y luego en la parte inferior, realizándose lo más rápido con el fin de evitar que se seque la lámina, ya que si esto ocurre las algas no se desprenden de la lámina (tiempo de cosecha por panel vertical: 2 minutos). De inmediato se retoma la recirculación de agua por la lámina (Figura 16).

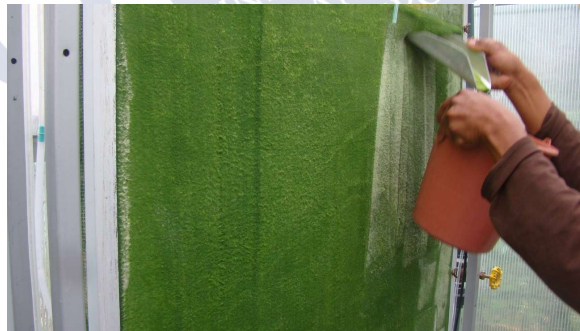


Figura 16. Procedimiento del cosechado de algas unicelulares

Tras la cosecha las microalgas inician una etapa de reproducción celular en la lámina textil, y en lo posterior tratan de inmovilizarse y formar colonias. Para Berner y col (2015) la formación de la biopelícula de microalgas comienza cuando las microalgas se adhieren a la superficie.

1.4 Conclusiones

La producción de algas unicelulares representa un desafío en cuanto al diseño y construcción de sistemas que permitan su desarrollo, y sobre todo que los modelos experimentales sean escalables para una producción industrial.

El prototipo se ubica en una instalación de 30 m² tipo invernadero con instalación en paralelo 16 unidades fotobiorreactoras y en las cuales se pueden dosificar por bloques de 4 unidades fotobiorreactoras, pero al ser un sistema modular puede expandirse a más unidades, en caso de ser necesario. El invernadero permite mantener a las unidades libres de los agentes externos y crea un ambiente idóneo para el desarrollo microalgal.

El sistema propuesto incluye una manga plástica para el almacenaje de los gases de combustión útil sobre todo cuando las emisiones generadas son intermitentes. La compresión de los gases se realiza en un compresor de que se distribuye a una cámara de gases en donde se puede mezclar con aire para disminuir la concentración y dosificar de acuerdo a las necesidades del cultivo.

El sistema de recirculación del medio de cultivo propuesto permite que la solución nutritiva humedezca la lámina textil de forma homogénea sin dejar espacios secos. Esto evita que a la larga puede provocar en el desarrollo de microorganismos no deseados en el panel.

El uso de poliestireno expandido en la estructura del fotobiorreactor permite que el sistema sea más liviano y de fácil construcción, permitiendo además se logra mantener las cámaras internas de gases de combustión totalmente aisladas del medio externo. De esta manera se

crea un ambiente totalmente diferente al del exterior lo que propicia la interacción de las microalgas en este ambiente.

El sistema propuesto puede ser implementado en la industria generadora de gases de combustión y de esta manera podría lograr disminuciones importantes de gases emitidos a la atmósfera, además constituye en un nuevo negocio de producción de microalgas de múltiples usos facilitando la economía circular y la neutralidad climática de la industria en cuestión.

1.5 Referencias bibliográficas

- Berner, F., Heimann, K., & Sheehan, M. (2015). Microalgal biofilms for biomass production. *J Appl Phycol*, *27*, 1793–1804. doi:<https://doi.org/10.1007/s10811-014-0489-x>
- Boelee, N., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C., & Wijffels, R. (2014). Balancing the organic load and light supply in symbiotic microalgal–bacterial biofilm reactors treating synthetic municipal wastewater. *Ecological Engineering*, *64*, 213–221. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.12.035>
- Borowiak, D., Lenartowicz, P., Grzebyk, M., Wiśniewski, M., Lipok, J., & Kafarski, P. (s.f.). Novel, automated, semi-industrial modular photobioreactor system for cultivation of demanding microalgae that produce fine chemicals—The next story of *H. pluvialis* and astaxanthin. *Algal Research*, *53*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102151>.
- Cheng, J., Huan, Y., Feng, J., Sun, J., Zhou, J., & Cen, K. (2013). Improving CO₂ fixation efficiency by optimizing *Chlorella* PY-ZU1 culture conditions in sequential bioreactors. *Bioresource Technology*, *144*, 321–327. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.041>

- Choudhary, P., Malik, A., & Pant, K. (2017). Igal Biofilm Systems: An Answer to Algal Biofuel Dilemma. *Algal Biofuels*, 77-96. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-51010-1_4
- D'Imporzano, G., Veronesi, D., Salati, S., & Adani, F. (2018). Carbon and nutrient recovery in the cultivation of *Chlorella vulgaris*: A life cycle assessment approach to comparing environmental performance. *Journal of Cleaner Production*, 194, 685-694. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.174>
- European Comission. (2018). *A sustainable bioeconomy for Europe: strengthening the connection between economy, society and the environment* . Brussels. Obtenido de <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/edace3e3-e189-11e8-b690-01aa75ed71a1/language-en/format-PDF/source-149755478>
- Garbowski, T., Jolanta , A., Pulikowski , K., & Wiercik , P. (2017). Algae proliferation on substrates immersed in biologically treated sewage. *Journal of Ecological Engineering . Ecol.*, 18(1), 90-98. doi:<https://doi.org/10.12911/22998993/66253>
- IPCC. (2019). *Calentamiento global de 1,5°C*. (G. I. Climático, Ed.) Recuperado el 11 de Julio de 2021, de https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/sites/2/2019/09/IPCC-Special-Report-1.5-SPM_es.pdf
- Kesaano, M., & Sims, R. (2014). Algal biofilm based technology for wastewater treatment. *Algal Research*, 231-240. doi:<https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.02.003>
- Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Langerhove, H. (2010). Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, 28(7), 371-380. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.04.004>

- Mantzorou, A., & Ververidis, F. (2019). Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. *Science of The Total Environment*, 651(Part 2), 3187-3201. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.355>
- Naciones unidas . (s.f.). Programa 21 Obtenido de <https://www.un.org/spanish/esa/sustdev/agenda21/agenda21toc.htm>
- Pires, J. (2019). Negative emissions technologies: A complementary solution for climate change mitigation. *Science of The Total Environment*, 672, 502-514. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.004>.
- Seung, L., Hee, O., Beom, J., Sang, L., Sang, S., Hee, K., . . . Chi, A. (2014). Higher Biomass Productivity of Microalgae in an Attached Growth. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 1566-1573. doi:<https://doi.org/10.4014/jmb.1406.06057>
- Shenawy, E., Elkelawy, M., Bastawissi, H., Taha, M., Panchal, H., & Sadasivun, K. (2020). Effect of cultivation parameters and heat management on the algae species growth conditions and biomass production in a continuous feedstock photobioreactor. *Renewable Energy*, 148, 807-815. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.10.166>
- Syrpas, M., & Rimantas, P. (2020). Chapter 6 - Algae for the production of bio-based products. *Biobased Products and Industries*, 203-243. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818493-6.00006-3>
- Universidad Politécnica de Madrid (2010). Fotobiorreactor laminar para la producción de microalgas (España Patente No. 2347515). Oficina Española de Patentes y Marcas

Way, Y., Pau, S., Jo, C., Tau, L., & Joon, J. (2015). Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 190-201. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.026>.

Zippel, B., & Neu, T. (2005). Growth and structure of phototrophic biofilms under controlled light conditions. *Water Science & Technology*, 52(7), 203-209. doi:<https://doi.org/10.2166/wst.2005.0202>



Capítulo 2. EVALUACIÓN DE MATERIALES TEXTILES Y TIEMPOS DE RECIRCULACIÓN DE SOLUCIÓN NUTRITIVA EN UNIDADES FOTOBIORREACTORAS

Resumen

La adhesión de las microalgas al soporte tipo lámina del fotobiorreactor es un aspecto clave en el desarrollo de un sistema modular de unidades fotobiorreactores ya que de ello depende el crecimiento de las mismas. Una vez adheridas, para la colonización y crecimiento de las algas unicelulares en la lámina es necesario que se produzca una recirculación de agua en el sistema de forma estable. Esto supone el bombeo del medio nutritivo por todo el sistema, por lo tanto, la optimización de los tiempos de conexión de la recirculación que es muy importante para disminuir los costes de la producción de microalgas. El objetivo de este estudio fue determinar que material de soporte de la lámina del fotobiorreactor es el más adecuado para la optimización del crecimiento de microalgas y los tiempos de conexión de las bombas de recirculación óptimos con el fin de disminuir costes. Se evaluó el uso de 4 tipos de láminas textiles (Filtro sintético, filtro con mezcla de lana, tela polar 100% poliéster y tela tricot) sin inyección de gases de combustión. A través de las láminas textiles se introdujo un medio de cultivo en el que previamente se inoculó *Scenedesmus* sp, y se adicionó 1 ml L⁻¹ de Nitrofoska foliar TM, con una caudal de recirculación de 5 L min⁻¹. La lámina textil que presentó una producción significativamente mayor de *Scenedesmus* sp. fue la tela polar con fibras textiles de 100% poliéster. Para determinar el tiempo de conexión del sistema de recirculación de la solución nutritiva en la lámina textil se emplearon cuatro frecuencias

de encendido: T1 encendido todo el tiempo (testigo), T2 encendido 6 minutos y apagado 2 minutos (75:25), T3 encendido 5 minutos y apagado 5 minutos (50:50), y T4 encendido 3 minutos y apagado 9 minutos (25:75). Los resultados mostraron que el tratamiento T1 incrementó significativamente la producción de materia seca en comparación con el resto. Esto nos permite concluir que no es posible la reducción de costes por el encendido y apagado de la bomba de recirculación de solución nutritiva.

Palabras clave: Fotobiorreactor, microalgas, *Scenedesmus*, lámina textil, recirculación.



Abstract

The adhesion of the microalgae to the foil-type support of the photobioreactor is a key aspect in the development of a modular system of photobioreactor units since their growth depends on it. Once adhered, for the colonization and growth of the unicellular algae in the sheet it is necessary that a recirculation of water takes place in the system in a stable way. This involves pumping the nutrient medium throughout the system, therefore optimizing the recirculation connection times, which is very important to reduce the costs of microalgae production. The objective of this study was to determine which support material for the photobioreactor sheet is the most suitable for optimizing the growth of microalgae and the optimal connection times of the recirculation pumps in order to reduce costs. The use of 4 types of textile sheets was evaluated (synthetic felt, wool blend felt, 100% polyester polar fabric and tricot fabric) without injection of combustion gases. A culture medium in which *Scenedesmus* sp was previously inoculated was introduced through the textile sheets, and 1 ml L⁻¹ of foliar Nitrofoska TM was added, with a recirculation flow rate of 5 L min⁻¹. The textile sheet that presented a significantly higher production of *Scenedesmus* sp. it was the polar fabric with 100% polyester textile fibers. To determine the connection time of the nutrient solution recirculation system in the textile sheet, four switching frequencies were used: T1 on all the time (witness), T2 on 6 minutes and off 2 minutes (75:25), T3 on 5 minutes and off 5 minutes (50:50), and T4 on 3 minutes and off 9 minutes (25:75). The results showed that the T1 treatment significantly increased the dry matter production compared to the rest. This allows us to conclude that it is not possible to reduce costs by turning the nutrient solution recirculation pump on and off.

Keywords: Photobioreactor, microalgae, *Scenedesmus* sp, textile sheet, recirculation.

2.1 Introducción

En la actualidad existen varios sistemas de producción de algas unicelulares que, si bien se ha constatado su uso a nivel experimental, su empleo a nivel industrial es limitante por los costes que representa. Los sistemas de cultivo de microalgas que actualmente se conocen se pueden clasificar en dos tipos: sistemas abiertos y sistemas cerrados. En los sistemas de cultivo abiertos, si bien son más económicos, el rendimiento en la producción de microalgas se ve reducido por dificultades asociadas al tamaño del tanque de cultivo, pues necesita luz para que las algas se desarrollen, y requiere un control riguroso de las condiciones ambientales para evitar, sobre todo, la contaminación con otros microorganismos. Por lo general, se componen de tanques diseñados para captar la mayor cantidad de luz solar con subsistemas de mezcla y aireación para facilitar la mayor producción posible (Borowiak y col., 2021). Entre los sistemas de cultivo cerrados se encuentran los fotobiorreactores en donde las algas unicelulares circulan para lograr captar la mayor cantidad de energía solar. Este sistema si bien es más eficiente, se ve limitado por su elevado coste, aunque presenta como ventaja los elevados rendimientos. Este tipo de sistemas de cultivos son especialmente útiles para su empleo con productos de alto valor añadido como aquellos asociados a la producción de productos biofarmacéuticos o formando parte como componentes de alimentos saludables (Borowiak, y col., 2021) cuyo retorno económico compensa los mayores costes de producción.

Según la clasificación de Berner y col. (2015), los sistemas de cultivo cerrados incluyen biopelículas que se pueden dividir en: biopelícula permanentemente sumergida, biopelícula entre dos fases y biopelícula permeada. En la primera las microalgas están sumergidas permanentemente en el medio de cultivo, en la segunda el sistema está sumergido de forma intermitente, y en la tercera utiliza un sustrato poroso que aporta nutrientes y humedad a las microalgas que crecen en el exterior rodeadas por una fase gaseosa.

Sobre los sistemas de biopelícula permeada se han desarrollado a nivel experimental estudios relacionados con fotobiorreactores muy novedosos, entre ellos se encuentran aquellos que utilizan un biofilm o lámina porosa en donde se suspenden las microalgas y forman verdaderas colonias gracias a su capacidad de agruparse. Las ventajas de los sistemas de biofilm incluyen un menor requerimiento de agua en comparación con los cultivos en suspensión (Mantzorou & Ververidis 2019), un reducido precio de las superficies de sujeción de las microalgas, una mayor productividad de biomasa de las biopelículas de microalgas que los sistemas en suspensión así como una mayor concentración en superficies reducidas de las biopelículas de algas, menor contenido de humedad de la biomasa generada tras recolección, inóculo disponible a partir de las colonias que permanecen en medio recirculante para el siguiente ciclo de crecimiento y una mayor disponibilidad de luz para las microalgas. Estas ventajas permiten el empleo de los sistemas de biofilm de forma factible en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Es a destacar que la producción de algas con láminas, la cosecha se facilita enormemente, pues la recolección de la biomasa se hace de una manera más sencilla que en el sistema tradicional abierto, y sobre todo se colecta menos agua. Siendo este uno de los inconvenientes del sistema tradicional, ya que requiere más energía para extraer tanto las microalgas como el agua asociada a las mismas. Se estima que la biomasa de microalgas obtenida del biofilm contiene entre un 80 y 90% de agua en lugar de más del 99% que contiene la cosecha de microalgas producidas bajo el régimen de cultivos en suspensión (Gross y col., 2013).

En la actualidad no se tiene constancia de estudios que hayan evaluado diferentes materiales textiles para las láminas a la que se adhieren las microalgas en el marco de la patente descrita en el capítulo 1 de esta tesis, ni tampoco se ha estudiado el efecto de diferentes periodos de encendido y apagado en sus unidades fotobiorreactoras.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar distintos materiales textiles en los que se adhiere las microalgas con el fin de optimizar la producción y la difusión de gases por toda la unidad fotobiorreactora, y

además evaluar la variación del tiempo de conexión y desconexión de la recirculación de solución nutritiva l sistema de fotobiorreactores.

2.2. Materiales y métodos

Scenedesmus sp se propagó en el laboratorio de microalgas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, a partir de una muestra de 100 ml se reprodujo en envases de vidrio de 500 ml y luego en envases plásticos de 5 litros con una fuente de iluminación con lámparas fluorescentes (7640 +/- 31,08 lux) con burbujeo de aire para mantener oxigenado el medio, como medio nutritivo se utilizó Nitrofoska (1 ml L⁻¹) y con un fotoperiodo de 12:12. Luego se pasó a la producción en bidones de 20 litros en un invernadero, en esta etapa se suspende la iluminación artificial y se mantiene la oxigenación y nutrición.

Las microalgas multiplicadas en bidones se trasladaron sistema de unidades fotobiorreactoras modificadas a partir de la patente ES 2 347 515 A1 (Anexo 1). Se utilizó un caudal de agua de recirculación de 5 L min⁻¹ sin interrupciones durante todo el ensayo considerado como óptimo ya que caudales menores no permiten un humedecimiento de toda la lámina textil y si son mayores provoca un exceso de agua en los paneles, tal y como se describió en el capítulo 1.

La cosecha de algas unicelulares en las unidades fotobiorreactoras se realizó cada 7 días, tiempo necesario para que el medio algal se renueve y posibilite hacer nuevas cosechas (Anexo 3). Boelee y col (2013) investigaron el efecto de la frecuencia de recolección resultando producciones de biomasa mayores cada 2 a 7 días (7 g m⁻²d⁻¹) mientras que si la recolección se realiza a los 20 días el rendimiento baja (2,7 g m⁻²d⁻¹). Por ello decidimos que la frecuencia de recolección óptima es de una vez a la semana para la unidad biorreactora que maximiza la biomasa de la cosecha reduciendo los costes asociados a la misma. Dentro de este período, la biopelícula se mantiene estable.

2.2.1 Material de soporte

Los materiales textiles objeto de estudio fueron:

T1: Filtro sintético o paño lency el cual se fabrica comprimiendo capas de fibras de acrílico a través de la presión y la aplicación de humedad ya que este tejido tiene la propiedad de adherirse entre sí. Este filtro se comercializa con dimensiones de 1 metro de largo x 1,50 de ancho, y 1,5 mm de grosor, al ser este sintético no es biodegradable y presenta elevada rigidez lo que le hace propenso a romperse si se estira demasiado.

T2: Filtro con mezcla de lana el cual se fabrica mediante la conglomeración de presión y vapor usando lana o pelo de algunos animales como la alpaca y rayón resultando más suave que el sintético además posee características resistencia a la compresión y tensión, un buen aislante contra la transmisión de calor y sonido, resistente a la temperatura, propiedades filtrantes y resistente a químicos. Este filtro puede venir en tamaños parecidos al material sintético, pero con un grosor mayor de 3mm.

T3: Tela polar fabricada en máquinas circulares con fibras textiles 100% poliéster, siendo así una imitación de la tela de lana, pero sintética. Resulta ser una alternativa ecológica debido a que también se la fábrica a partir de envases plásticos reciclables y posee propiedades como el gran aislamiento térmico y un bajo peso, tiene distintos gramajes desde 100 hasta 300 g m⁻². En este estudio se utilizó tuvo un espesor de 3mm y gramaje de 260 g m⁻².

T4: Tela tricot de poliéster es un material textil sintético formado por una fina capa de material sintético en poliéster y una capa de esponja, se usa principalmente como relleno y aislante térmico hecho a base de polímeros obtenido a partir del petróleo, tiene alta porosidad buena permeabilidad al aire, resistencia al ácido, alcalinidad moderada y muy buena resistencia al desgaste con un gramaje de 60 g m⁻².

La cosecha se realizó cada 7 días y se evaluaron variables de control de pH, conductividad eléctrica, absorbancia tanto en la solución recirculante como en la biomasa cosechada (Anexos 5, 6 y 8). Durante este experimento la media de temperatura fue 20,7 °C, con un valor

medio máximo de 31,8°C y un valor medio mínimo de 14,8°C (Anexo 2).



Figura 1. Distribución de las unidades experimentales en el invernadero

En este ensayo se evaluó los sólidos solubles, sólidos disueltos totales, volumen cosechado, materia seca, consumo de agua, concentración de CO₂, pH y número de microalgas.

2.2.2 Frecuencia de activación de la recirculación

Con el fin de determinar el tiempo que puede permanecer la unidad fotobiorreactora sin inyección de solución nutritiva, se evaluó la suspensión del flujo de solución nutritiva en el material textil a través de frecuencias de encendido del sistema: T1 (encendido todo el tiempo testigo), el tratamiento T2 (encendido 6 minutos y apagado 2 minutos (75:25)), el tratamiento T3 (encendido 5 minutos y apagado 5 minutos (50:50)), y el tratamiento T4 (encendido 3 minutos y apagado 9 minutos (25:75)). El flujo de solución nutritiva se mantuvo durante todo el ciclo de desarrollo del cultivo.

Se evaluó consumo de agua, materia seca y concentración de CO₂ (Anexo 4).

2.2.3 Determinaciones realizadas en los ensayos

Para la medición de los niveles de CO₂ inyectados en el sistema de paneles se utilizó un equipo ALNOR modelo COMPUFLOW 8610 con

un rango de 0 a 5000 ppm. El pH, la conductividad eléctrica, los sólidos solubles y los sólidos disueltos totales en el medio de cultivo y en la solución cosechada se analizó en un dispositivo marca HORIBA modelo F-74BW. La absorbancia en el medio de cultivo se determinó mediante el empleo del equipo Thermo Spectronic Modelo Genesis 20. En el conteo celular se utilizó un microscopio binocular Marca MOTIC Modelo BA210. Para determinar el volumen cosechado se apagó el sistema de circulación de solución nutritiva e inmediatamente se realiza un raspado con una espátula en el panel, posteriormente se acciona el sistema para que siga el desarrollo microalgal, se mide en una probeta la recolección.

La determinación de la materia seca de las microalgas cosechadas se llevó a cabo por centrifugado (Proanalytical) y posterior secado a 40°C en estufa hasta alcanzar peso constante. La productividad se estimó como la relación del peso neto de biomasa seca sobre superficie total del cultivo durante un período determinado. Con el fin de estandarizar el rendimiento de algas unicelulares en el sistema se optó por expresar en $\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ lo que nos permitió comparar nuestros resultados con los de otras investigaciones (Berner y col., 2014).

La medición del consumo de agua en la unidad fotobiorreactora se realizó por la cantidad de agua añadida al finalizar el día en el tanque de solución nutritiva.

2.2.4. Análisis estadístico

El análisis del efecto sobre los parámetros analizados de los distintos materiales textiles y los distintos tiempos de recirculación se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA). Previamente se analizó la normalidad de las variables y la homogeneidad de las varianzas. Cuando el ANOVA presentó diferencias significativas entre los tratamientos se realizó la prueba post hoc Tukey ($p < 0,05$). El programa empleado fue R Project.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Material de soporte

En la figura 2 se muestra los cuatro materiales probados (T1, T2, T3 y T4) durante el periodo de tiempo del ensayo. La tela tricot (T4) fue descartada durante la evaluación del ensayo debido a que se observó que no retenía suficiente humedad, lo que ocasionó una contaminación bacteriana y la consecuente muerte de algas unicelulares. Los materiales textiles T1, T2, y T3 fueron los que efectivamente si retuvieron agua con el consiguiente desarrollo de las microalgas.



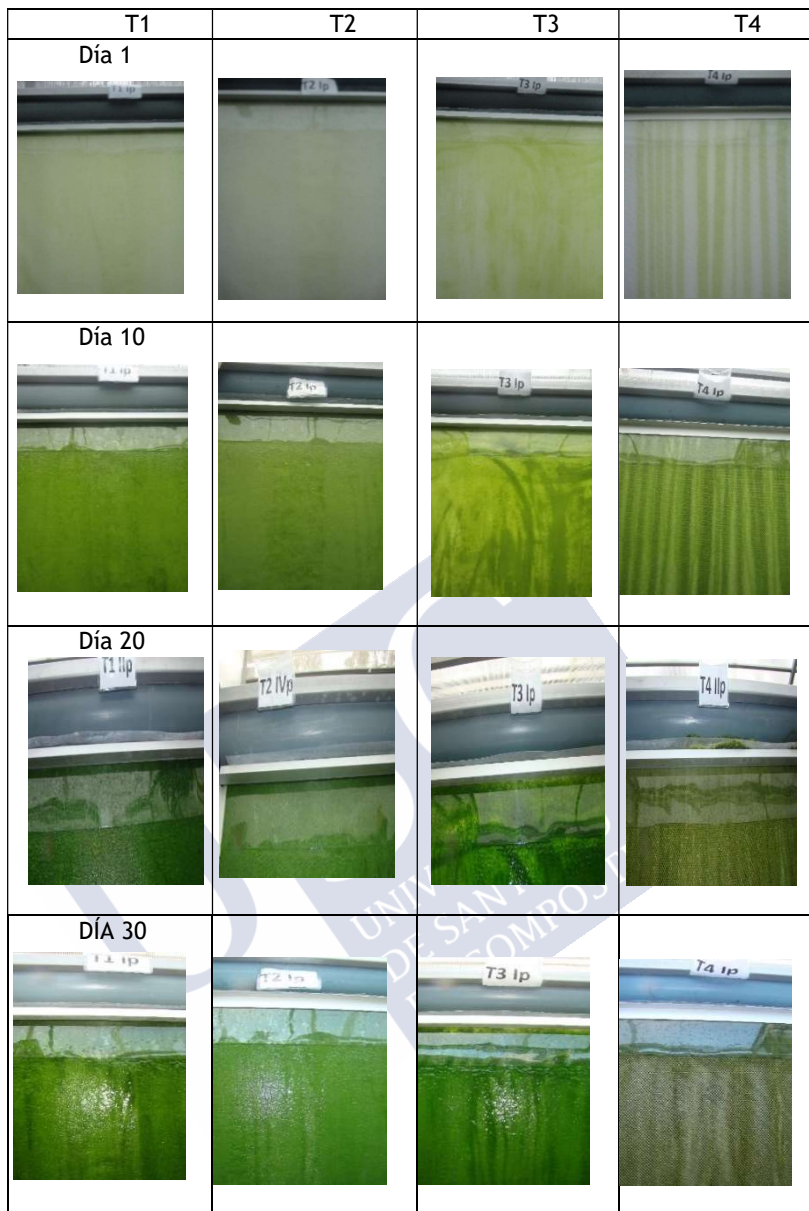


Figura 2. Evolución del crecimiento de las microalgas en las unidades fotobiorreactoras con distintos materiales (T1= Filtro sintético, T2= Filtro con mezcla de lana, T3= Tela polar, T4= Tela tricot).

En la tabla 1 se puede observar que, si bien en el análisis de sólidos solubles se encuentra una mayor producción de biomasa en el material textil T1, el contenido total de materia seca por litro de biomasa cosechada y el expresado por día es significativamente mayor en el material textil T3 (13,44 g L⁻¹ y 2,09 g m⁻² d⁻¹, respectivamente) que en los otros materiales utilizados (Anexo 7). El material textil T4 se descarta por su bajo contenido de materia seca (0,02 g m⁻²d⁻¹).

Tabla 1. Sólidos disueltos, sólidos solubles, volumen cosechado y materia seca de microalgas en los paneles en tratamientos con distintos materiales textiles testados en las unidades fotobiorreactoras. Para cada parámetro analizado si los tratamientos aplicados tienen la misma letra no presenta diferencias significativas (Tukey, p<0,05)

Variable	Unidad	T1	T2	T3	T4
Sólidos solubles (SS)	g L ⁻¹	15,18 ^a	12,57 ^b	12,12 ^b	10,76 ^b
Sólidos disueltos totales (SDT)	g L ⁻¹	0,35 ^a	0,32 ^a	0,28 ^a	0,28 ^a
SS+SDT	g L ⁻¹	15,53 ^a	12,90 ^b	12,40 ^b	11,04 ^b
Volumen cosechado	ml	583,75 ^a	694,25 ^b	1084,75 ^b	115,50 ^c
Materia seca	g L ⁻¹	9,09 ^b	8,99 ^b	13,44 ^a	1,28 ^c
Materia seca	g m ⁻² d ⁻¹	0,76 ^b	0,90 ^b	2,09 ^a	0,02 ^c

T1: Filtro sintético; T2: Filtro con mezcla de lana, T3: Tela polar, T4: Tela tricot.

Considerando estos resultados se optó por recomendar el material textil T3, pues presenta una mayor producción de microalgas en término de materia seca frente a los otros materiales utilizados.

En relación al consumo de agua el mayor se obtiene en el material textil T3 (p<0,05) con un valor de 3,5 L m⁻²d⁻¹ (Figura 3) en comparación con los otros tratamientos. Si bien en los tratamientos T1, T2 y T4 la evaporación de agua es similar, en el tratamiento T4 dada su estructura física de la lámina hay zonas en donde no hay una humedad constante y esto da lugar a la proliferación de bacterias quedando patente este crecimiento por la coloración que se observa en la lámina textil. Trabajos realizados por Murphy & Berberoğlu (2012) midieron

el consumo de agua en un fotobiorreactor de biopelícula y encontraron valores de 3,4, 1,0, 6,0 y 7,3 L m⁻²d⁻¹ en otoño, invierno, primavera y verano, respectivamente. Como el ensayo se desarrolló bajo invernadero y en condiciones ambientales estables durante todo el año el consumo de agua se mantuvo similar durante el tiempo que duró el experimento.

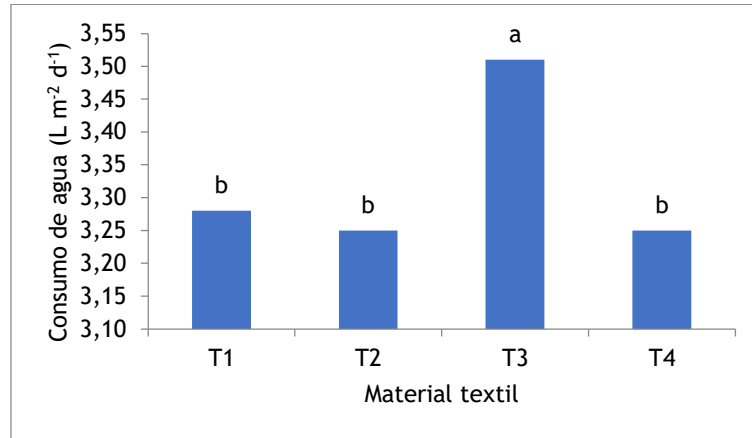


Figura 3. Consumo de agua diario del material textil utilizado. T1: Filtro sintético; T2: Filtro con mezcla de lana, T3: Tela polar, T4: Tela tricot. Tratamiento con la misma letra no presenta diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Es importante tener presente que las algas al ser fototróficas requieren de fuentes de carbono para su crecimiento que lo obtienen directamente del ambiente, si existen limitaciones de carbono su productividad disminuye (Gross, y col., 2013). Así pues, se estudió si los diferentes materiales textiles utilizados influían sobre las concentraciones de CO₂ presentes en interior de estos (Anexo 9). Los resultados muestran que los niveles de CO₂ son similares en todos los tratamientos, y por tanto no fue la causa de la diferencia en la producción de materia seca (Figura 4).

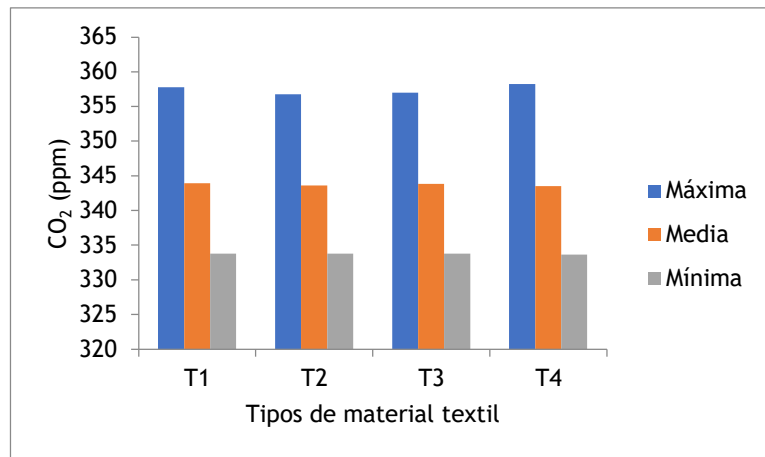


Figura 4. Valores máximos, medios y mínimos de CO₂ en cada material textil analizado. T1: Feltro sintético; T2: Feltro con mezcla de lana, T3: Tela polar, T4: Tela tricot

Por lo general, el crecimiento de las microalgas se ve favorecida con valores de pH entre 6 y 9 (Shen y col., 2014). En el material textil T3 el pH de la solución nutritiva es significativamente superior al resto (9,5), presentando el menor valor el material textil T1 (8,2). Si bien el pH está dentro de los valores sugeridos por Shen y col (2014), en el T3 lo sobrepasa. Sin embargo, fue el material que presenta una mayor productividad. Este hecho podría estar relacionado con que las algas tienen la capacidad de adaptarse a pH por encima de 9 liberando distintos compuestos que les permiten adaptarse a un medio muy básico (Zhang y col., 2011). De igual manera durante el ciclo de desarrollo del cultivo el pH fue estable en cada uno de los tratamientos (Figura 5). En relación con los resultados obtenidos el mayor pH obtenido en T3 no fue un factor limitante para la producción de microalgas, ya que en este tratamiento se obtuvieron los mayores contenidos en biomasa.

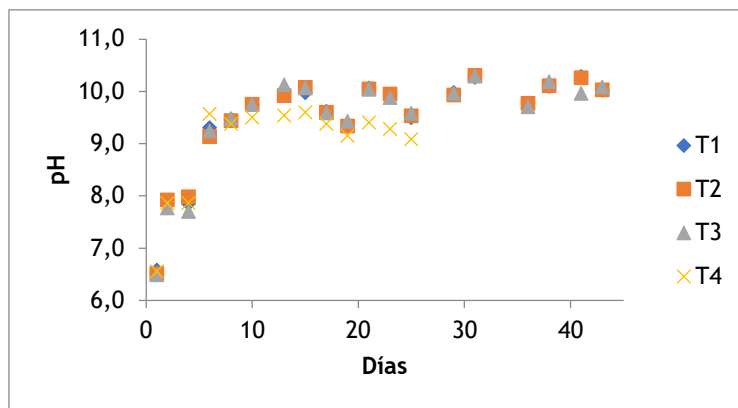


Figura 5. Evolución del pH durante el ciclo de cultivo. T1: Filtro sintético; T2: Filtro con mezcla de lana, T3: Tela polar, T4: Material sintético

En relación a la evolución del crecimiento de las células en el tanque de recirculación los resultados se muestran en la figura 6. En todos los tratamientos hay un crecimiento exponencial del número de células desde el día 4 hasta el día 13 y posteriormente su número disminuye. Esto es lo esperado ya que inicialmente se desarrollan en el medio recirculante y a lo largo del tiempo las algas se adhieren a la lámina textil, siendo la solución recirculante el medio para transportar nutrientes a las algas que crecen en la lámina. En relación al efecto de los tratamientos sobre este parámetro nuestros resultados muestran diferencias entre materiales, como puede observarse en T3 el número de células se mantiene muy por encima del resto a partir de la primera semana, lo que da cuenta de que en esta lámina hay un mejor crecimiento.

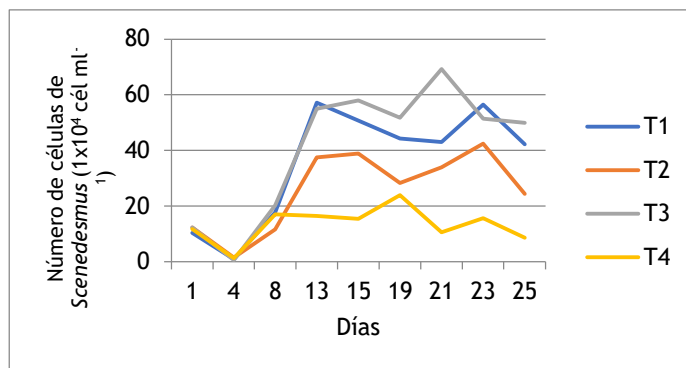


Figura 6. Evolución del número de células en el tanque de recirculación previo a la cosecha. T1: Filtro sintético; T2: Filtro con mezcla de lana, T3: Tela polar, T4: Tela tricot

Shen y col (2014) mencionan que en las biopelículas existen dos pasos a la hora de desarrollarse las microalgas, en el primero las células se adhieren a la lámina mediante adsorción para formar una película acondicionadora y en el segundo paso ya las células se adhieren de una manera irreversible. Por ello en el conteo celular en el tanque de recirculación las células disminuyen, esto significa que transcurridos los 25 días las células están adheridas a la lámina textil.

2.3.2 Frecuencia de activación de la recirculación

En el ensayo descrito en el apartado 2.3.1 se evaluó el tipo de material de soporte con un caudal constante de 5 L min^{-1} tal y como se indica en el capítulo 1. Sin embargo, es necesario estudiar las distintas frecuencias de encendido y apagado de la bomba de conducción de agua con el fin de estudiar la posibilidad de disminuir el consumo energético para ello se analizaron las variables de concentración de CO_2 , consumo de agua y producción de microalgas.

En este experimento una de las variables analizadas fue la concentración de CO_2 en los subpaneles (4 cámaras creadas por unidad fotobiorreactora), tanto por la mañana como en la tarde con el fin de confirmar la existencia de este gas en el interior de la misma y estudiar el efecto de la conexión de la recirculación sobre este parámetro, en

todas las unidades fotobiorreactoras se mantuvo un flujo constante de CO₂ por el valor de 1000 ppm. En cada día medido no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos, esto confirma que los diferentes tiempos de accionamiento de la bomba no afectan a la concentración de CO₂ en los subpaneles (Figura 7).

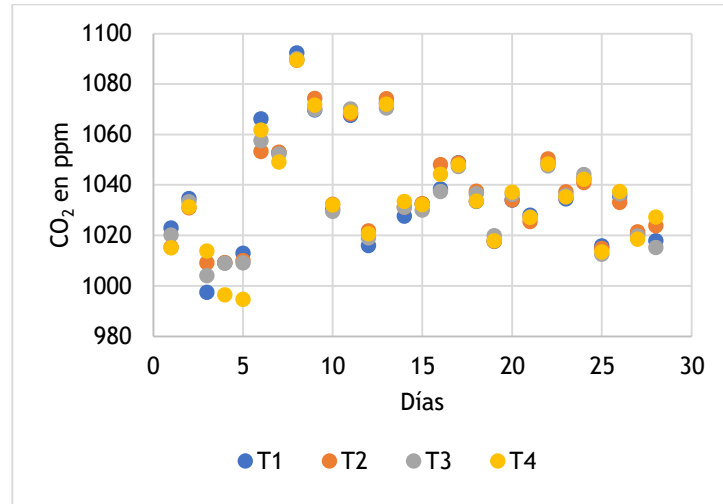


Figura 7. Concentración de CO₂ por día y por tratamiento (T1: Encendido todo el tiempo; T2: 6 minutos encendido y 2 minutos apagado; T3: 5 minutos encendido y 5 minutos apagado; T4: 3 minutos encendido y 9 minutos apagado)

Como se realizaron dos mediciones en el día se observaron variaciones de la concentración de CO₂ entre estas dos tomas de datos, en promedio la inyección de CO₂ en la mañana fue de 1041 ppm, mientras que en la tarde la concentración disminuye a 1033 ppm. Esto significa un decremento medio de 7,8 ppm (Figura 8). La inyección de CO₂ a los subpaneles ha sido constante y estable. La concentración de CO₂ en los paneles entre los diferentes tratamientos de encendido y apagado no muestra diferencias significativas entre los tratamientos.

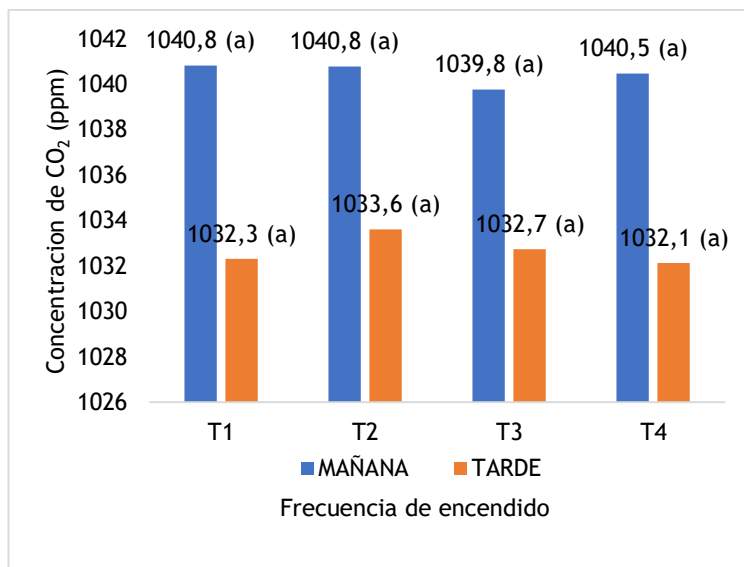


Figura 8. Concentración de CO₂ promedio, datos tomados a las 8 am y 15 pm (T1: Encendido todo el tiempo; T2: 6 minutos encendido y 2 minutos apagado; T3: 5 minutos encendido y 5 minutos apagado; T4: 3 minutos encendido y 9 minutos apagado). Para cada tratamiento aplicado si tienen la misma letra no presenta diferencias significativas entre la mañana y tarde (Tukey, $p < 0,05$)

En relación al consumo de agua, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos de encendido/apagado durante el día. Sin embargo, puede apreciarse un mayor consumo de agua en la unidad fotobiorreactora que se encuentra todo el tiempo humedecida. Para el consumo de agua en la noche (18h00-6h00), el tratamiento T1 (frecuencia de encendido todo el tiempo) presenta un consumo de agua significativamente mayor ($1,68 \text{ L m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) en comparación con el tratamiento T4 ($p < 0,05$) de esta manera se considera el tratamiento con mayor consumo de agua (Figura 9).

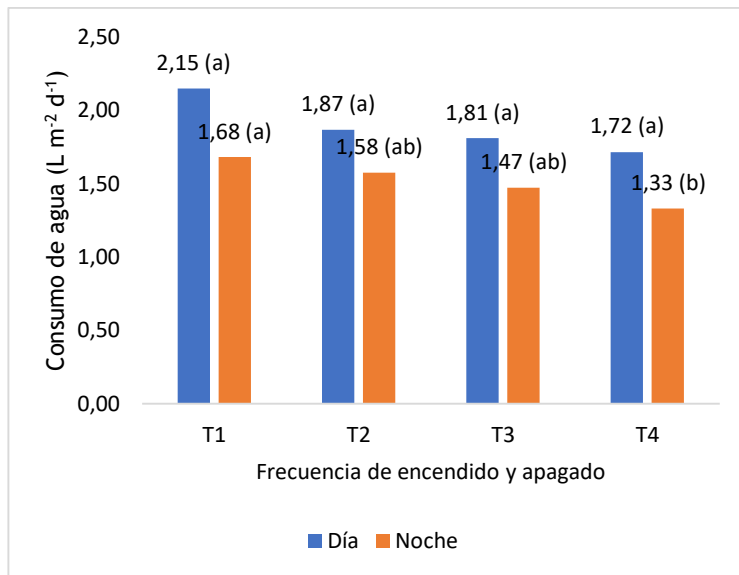


Figura 9. Consumo de agua (T1: Encendido todo el tiempo; T2: 6 minutos encendido y 2 minutos apagado; T3: 5 minutos encendido y 5 minutos apagado; T4: 3 minutos encendido y 9 minutos apagado). Para cada tratamiento aplicado si tienen la misma letra no presenta diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$)

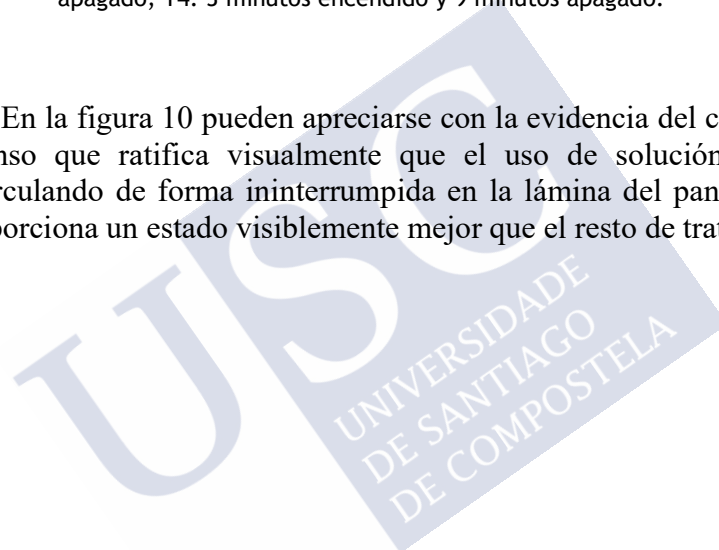
Con respecto al efecto de los tratamientos de encendido/apagado de la solución nutritiva sobre la producción de *Scenedesmus* sp en la primera cosecha no se encuentran diferencias significativas en la producción de materia seca. Sin embargo, en las cosechas 2, 3 y 4 el tratamiento T1 (encendido sin interrupciones) presenta una producción de materia seca de microalgas significativamente superior que el resto de tratamientos. Se puede observar que a medida que el tiempo de apagado del sistema se incrementa el rendimiento en materia seca disminuye. Se recomienda por lo tanto que el flujo de agua sea estable y sin interrupciones con el fin de lograr el máximo rendimiento (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de materia seca ($\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$) en la cosecha de microalgas en tratamientos con distintos tiempos de encendido. Para cada cosecha si los tratamientos aplicados tienen la misma letra no presenta diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$)

Tratamiento	Cosecha 1	Cosecha 2	Cosecha 3	Cosecha 4
T1	6.73 ^a	8.43 ^a	8.98 ^a	7.04 ^a
T2	6.09 ^a	5.19 ^b	5.50 ^b	4.06 ^b
T3	5.85 ^a	4.95 ^b	3.86 ^b	3.45 ^b
T4	5.79 ^a	4.21 ^b	3.01 ^b	2.85 ^b

T1: Encendido todo el tiempo; T2: 6 minutos encendido y 2 minutos apagado; T3: 5 minutos encendido y 5 minutos apagado; T4: 3 minutos encendido y 9 minutos apagado.

En la figura 10 pueden apreciarse con la evidencia del color verde intenso que ratifica visualmente que el uso de solución nutritiva recirculando de forma ininterrumpida en la lámina del panel vertical proporciona un estado visiblemente mejor que el resto de tratamientos.






 <p>Vista general de las unidades fotobiorreactoras</p>	 <p>Vista de las unidades fotobiorreactoras, en donde se observa el humedecimiento de la lámina textil tras el encendido automático de la bomba de recirculación</p>
 <p>Tratamiento T1 (Todo el tiempo encendido): Se aprecia color verde intenso homogéneo en toda la lámina, lo que evidencia un buen crecimiento de las algas unicelulares.</p>	 <p>Tratamiento T2 (6 minutos encendido y 2 minutos apagado): Se aprecian ligeras manchas blancuecinas, en donde aparentemente no se desarrollan algas unicelulares.</p>
 <p>Tratamiento T3 (5 minutos encendido y 5 minutos apagado): Las manchas blancuecinas se acentúan lo que deja menor espacio de crecimiento de microalgas</p>	 <p>Tratamiento T4 (3 minutos encendido y 9 minutos apagado): Las manchas blancuecinas se proliferan en toda la lámina incrementándose los espacios vacíos con la posterior afectación de bacterias.</p>

Figura 10. Desarrollo de las microalgas en el material textil de soporte con relación a la frecuencia de encendido y apagado de la bomba de recirculación.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia que la interrupción del sistema de recirculación de agua con el fin de reducir el consumo energético reduce la eficacia del fotobiorreactor laminar, ya que afecta al desarrollo y por tanto a la producción de las microalgas cultivadas en las unidades fotobiorreactoras.

2.4 Conclusiones

El material textil T3 (Tela polar fabricada 100% poliéster) permite que se adhiera y se desarrolle mejor *Scenedesmus* sp. Por otra parte, el T3 facilita la recolección y que la biomasa tenga una menor cantidad de agua, lo que genera un ahorro al comparar con otros sistemas tradicionales, y evita el crecimiento de bacterias que afectan a la producción.

El sistema al ser de ciclo continuo permite que la cosecha se realice de forma periódica sin necesidad de volver a instalar un nuevo cultivo (con intervalos de 7 días). Además, la cosecha se facilita ya que se obtiene algas concentradas y se disminuyen los costes por extracción de agua en la solución cosechada.

La interrupción de la recirculación del agua y medio de cultivo con el fin de disminuir el consumo energético no es viable ya que provoca un menor desarrollo de las microalgas en las unidades fotobiorreactoras.

La producción a gran escala de microalgas representa un desafío a nivel de implementación de nuevas tecnologías, materiales y procesos que permitan incrementar los niveles obtenidos en laboratorio, optimizando los costes de producción. Sobre todo, porque al considerarse como un sistema que captura gases de combustión (CO_2) estamos por un lado disminuyendo los niveles de contaminación (emisiones de gases de efecto invernadero), y por otro se obtiene algas para múltiples usos de alto valor añadido.

2.5 Referencias bibliográficas

- Berner, F., Heimann, K., & Sheehan, M. (2015). Microalgal biofilms for biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1793-1804. doi:doi:10.1007/s10811-014-0489-x
- Boelee, N., Temmink, H., Janssen, M., Buisman, C., & Wijffels, R. (2014). Balancing the organic load and light supply in symbiotic microalgal–bacterial biofilm reactors treating synthetic municipal wastewater. *Ecological Engineering*, 64, 213-221. doi:https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.12.035
- Borowiak, D., Lenartowicz, P., Grzebyk, M., Wiśniewski, M., Lipok, J., & Kafarski, P. (s.f.). Novel, automated, semi-industrial modular photobioreactor system for cultivation of demanding microalgae that produce fine chemicals—The next story of *H. pluvialis* and astaxanthin. *Algal Research*, 53. doi:https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102151.
- Gross, M., Wesley, H., Michael, C., & Wen, Z. (2013). Development of a rotating algal biofilm growth system for attached microalgae growth with in situ biomass harvest. *Bioresour Technol*, 150, 195-201. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.016
- Mantzorou, A., & Ververidis, F. (2019). Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. *Science of The Total Environment*, 651(Part 2), 3187-3201. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.355
- Murphy, T., & Berberoğlu, H. (2012). Temperature Fluctuation and Evaporative Loss Rate in an Algae Biofilm Photobioreactor. *Solar Energy Engineering*, 134(1). doi:https://doi.org/10.1115/1.4005088
- Shen, Y., Xu, X., & Zhao, Y. (2014). Influence of algae species, substrata and culture conditions on attached microalgal culture.

(441-450, Ed.) *Bioprocess Biosyst Eng*, 37.
doi:<https://doi.org/10.1007/s00449-013-1011-6>

Zhang, H., Kuang, Y., Lin, Z., & Liu, C. (2011). Influence on Surface Characteristics of Microalgae Cell by Solution Chemistry. *Advanced Materials Research*, 287-290, 1938-1942.
doi:<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.287-290.1938>



Capítulo 3. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GASES Y NUTRIENTES EN EL SISTEMA DE FOTOBIORREACTORES

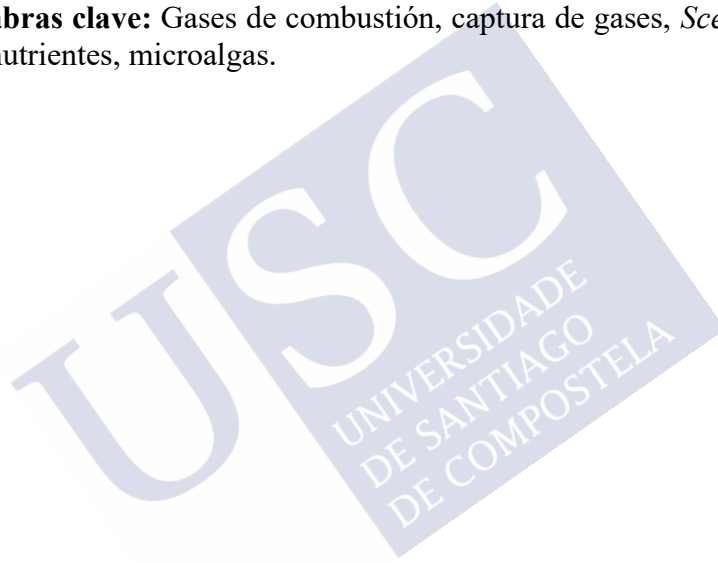
Resumen

El estudio de las microalgas está permitiendo el desarrollo de nuevas tecnologías con el fin de capturar gases de combustión responsables del efecto invernadero. De esta manera se puede valorizar el CO₂ procedente de las emisiones en la producción de microalgas consiguiendo por una parte un objetivo ambiental, evitando o reduciendo emisiones de CO₂, y por otra parte el de producción de microalgas con fines industriales.

Con el fin de optimizar el proceso de crecimiento de las microalgas a nivel industrial en los diferentes sistemas establecidos es necesario conocer los requerimientos de nutrientes y la concentración óptima de CO₂ en unidades fotobiorreactoras, ya sea por un lado aumentar la captación de gases de combustión y por otro lado incrementar la productividad microalgal. En relación a la evaluación del efecto de la dosis de nutrientes sobre distintos parámetros, en el sistema de unidades fotobiorreactoras implementado para la producción piloto de microalgas detallado en los capítulos 1 y 2, se evidenciaron altos rendimientos de producción de microalgas con una concentración de 100 ppm de N durante las 7 cosechas evaluadas alcanzando un máximo rendimiento en la cosecha 5 (2,95 gm⁻²d⁻¹) siendo sus diferencias significativas. Por otra parte, en este sistema, se estudió la influencia de 3 concentraciones de CO₂ (500 ppm, 1000 ppm y 1500 ppm). El CO₂, se suministró mediante el empleo de un generador eléctrico accionado por diésel, empleando un flujo de caudal de agua de 5 litros por minuto.

Se usó la microalga *Scenedesmus* a la cual se adicionó la solución nutritiva de Nitrofoska a 1 ml L^{-1} para favorecer su crecimiento. El suministro de los gases de combustión fue constante durante el día desde las 7h00 a 18h00, por la noche se suspendió. No existieron diferencias significativas en términos de producción de materia seca en las concentraciones de gases usados por lo que no se ve influenciada por la concentración de gases empleada. Así, se pueden emplear altas concentraciones de gases que no se vería afectado su rendimiento en el rango propuesto en este estudio. De esta manera se capturan los gases de combustión en biomasa microalgal que en lo posterior puede ser usada como bioestimulante.

Palabras clave: Gases de combustión, captura de gases, *Scenedesmus* sp, nutrientes, microalgas.



Abstract

The study of microalgae is allowing the development of new technologies in order to capture combustion gases responsible for the greenhouse effect. In this way, the CO₂ from emissions in the production of microalgae can be valued, achieving, on the one hand, an environmental objective, avoiding or reducing CO₂ emissions, and on the other hand, the production of microalgae for industrial purposes.

In order to optimize the microalgae growth process at an industrial level in the different established systems, it is necessary to know the nutrient requirements and the optimal concentration of CO₂ in photobioreactor units, either on the one hand increasing the uptake of combustion gases and on the other hand, increase microalgal productivity. In relation to the evaluation of the effect of 4 doses of nutrients on different parameters, in the system of photobioreactor units implemented for the pilot production of microalgae detailed in chapters 1 and 2, high yields of microalgae production were evidenced with a concentration of 100 ppm of N during the 7 evaluated harvests, reaching a maximum yield in harvest 5 (2.95 gm⁻²d⁻¹), their differences being significant. On the other hand, in this system, the influence of 3 concentrations of CO₂ gases (500 ppm, 1000 ppm and 1500 ppm) was studied. The CO₂ was supplied by using an electric generator powered by diesel, using a water flow rate of 5 liters per minute. The microalgae *Scenedesmus* was used to which the nutrient solution of Nitrofoska was added to 1 ml L⁻¹ to promote its growth. The supply of combustion gases was constant during the day from 7:00 to 18:00, at night it was suspended. There were no significant differences in terms of dry matter production in the concentrations of gases used, so it is not influenced by the concentration of gases used. This means that high concentrations of gases can be used that would not affect their performance in the range proposed in this study. In this way, the combustion gases are captured in microalgal biomass that can later be used as a biostimulant.

Keywords: Combustion gases, gas capture, *Scenedesmus* sp, nutrients, microalgae.

3.1 Introducción

Las microalgas se consideran entre los primeros organismos vivos que aparecieron en la tierra, y fueron las responsables de absorber el CO₂ atmosférico y transformarlo en glucosa y oxígeno. Pueden producir carbohidratos, lípidos, proteínas, pigmentos, vitaminas y otros productos químicos de valor agregado. Estos organismos tienen una tasa de crecimiento rápida y una alta productividad de lípidos (Lu y col., 2020).

Las microalgas constituyen en la actualidad una opción para la producción de biomasa con múltiples usos que puede ser usada como suplemento animal, producción de biocombustibles, y separación de componentes tanto para alimentación humana o usos específicos en la industria. Por ejemplo, los lípidos de las microalgas se pueden utilizar como materia prima para la producción de biodiesel, los carbohidratos como fuente de carbono en la industria de fermentación, los ácidos grasos de cadena larga se utilizarían como complementos alimenticios saludables, mientras que las proteínas y pigmentos se usarían para tratar enfermedades (Chew y col., 2017).

La clave en la producción de biomasa microalgal se encuentra en la optimización de las condiciones de crecimiento (Blair y col., 2014), entre los parámetros de control clave en el desarrollo se encuentra la iluminación, pH y temperatura (Chegukrishnamurthi y col., 2020), además los nutrientes bien de uso agrícola o procedentes de subproductos animales, que en nuestro caso queremos ajustar a las condiciones del fotobiorreactor adaptado que se describe en los capítulos 1 y 2 de esta tesis.

El cultivo de microalgas en laboratorio se ha desarrollado de forma importante en las últimas décadas. Así existen estudios validando el uso de medios de cultivo preparados en laboratorio con el fin de incrementar la producción de especies de microalgas que tienen un elevado coste en Ecuador como el Chu-10 modificado (Sharma y col., 2011). Lee & Zhang (2016) estudiaron varios factores físico-químicos que influyen en el crecimiento microalgal como el nitrógeno y el dióxido de carbono,

la intensidad de la luz y la temperatura. En este sentido, es necesario optimizar la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo de las microalgas para determinar la concentración limitante. Para Kumar y Bera (2020) el nitrógeno es el segundo elemento más abundante en las algas constituyéndose como el principal para su crecimiento.

La captura de gases de combustión y su posterior inyección en un cultivo de microalgas se considera en la actualidad una de las tecnologías más prometedoras que consumen menos energía (Young y col, 2019). La adición de CO₂ a *Scenedesmus* aumenta notablemente la productividad de su biomasa (Shayesteh y col, 2021). De esta manera es importante su estudio y sobre todo en el sistema implementado.

Si se conocen las necesidades nutricionales de las microalgas, podemos ir reemplazando dichos medios comerciales por otros que sean más económicos y ecológicos. Estudios con aguas residuales permiten usar medios nutritivos que de otra manera podrían contaminar otros efluentes. Especies de microalgas como *Scenedesmus* y *Chlorella* se han adaptado a condiciones muy extremas como las aguas residuales de tenerías (Nagi y col., 2020).

Este estudio tiene como objetivo principal evaluar el crecimiento de *Scenedesmus* con distintas dosis de nutrientes y con diferentes concentraciones de CO₂ en unidades fotobiorreactores simulando condiciones de dimensionamiento para la producción a gran escala.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Optimización de la dosis de nutrientes

Para la optimización de las dosis de nutriente en el sistema de biorreactores descrito en los capítulos 1 y 2 se propagó inicialmente el cultivo de *Scenedesmus* sp en los paneles con una sola dosis de nutriente de Nitrofoska (1 ml L⁻¹). Transcurridos 12 días de la siembra se procede a añadir las dosis de nutriente Nitrofoska requeridas para el ensayo en concentración de Nitrógeno de D1: 100 mgL⁻¹; D2: 200 mgL⁻¹; D3: 300

mgL⁻¹; y D4: 400 mgL⁻¹. El único tratamiento en donde se añade solución nutritiva extra es en D1 con el fin de mantener una solución estable de 100 mgL⁻¹ de N durante todo el ensayo y esto debido a que transcurrida la cosecha los niveles de nitratos disminuyen. Se mantiene inyección constante de aire a cada unidad fotobiorreactora (Anexos 1, 2, 3). El tiempo de duración del ensayo fue de 70 días con 7 cosechas con espaciamentos de 7 días.

3.2.2 Optimización de la concentración de gases

En el sistema empleado se estudió el efecto de la concentración de CO₂ en 16 unidades fotobiorreactoras en las condiciones que se describen en los capítulos 1 y 2. La microalga utilizada fue *Scenedesmus* sp (identificado por Morales, 9 de mayo del 2016, Anexo 4) y se utilizó una solución nutritiva de Nitrofoska (1 ml L⁻¹). Las concentraciones de CO₂ ensayadas fueron de 500 ppm, 1000 ppm y 1500 ppm. El ingreso de gases de combustión al sistema se realizó durante 12 horas seguidas (6h hasta 18h) y 12 horas sin suministro (18h hasta 6h). La temperatura en la fase del ensayo se mantuvo en un promedio de 20,87°C (máxima de 26,50°C y mínima de 16,13°C) como se puede apreciar en detalle en el Anexo 5.

3.2.3 Determinaciones

Para la medición de los niveles de CO₂ en las unidades fotobiorreactoras se utilizó un equipo marca ALNOR modelo COMPUFLOW 8610 con un rango de 0 a 5000 ppm con una resolución de lectura de ±3%. La toma de datos se realizó en cada cavidad creada de la unidad (subpanel), para esto se acopló una unión a cada manguera flexible de tal manera que al momento de realizar la lectura se separa, se coloca el equipo y se une inmediatamente la unión, este proceso toma menos de 1 minuto. La concentración de CO₂ en las unidades fotobiorreactoras se midió diariamente (Figura 2).

Para determinar el pH, conductividad eléctrica, sólidos disueltos totales y sales en la solución nutritiva se empleó un dispositivo conjunto marca HORIBA modelo F-74BW. Se tomó una muestra de 50 ml del tanque en donde se encuentra la solución nutritiva a través de una manguera de retorno acoplada a la unidad fotobiorreactora, una vez tomada la medición con el equipo de estas variables se retornó la muestra, la medición se realizó diariamente durante todo el ciclo evaluado.

La absorbancia (750 nm) en la solución nutritiva se determinó diariamente mediante el empleo del equipo Thermo Spectronic Modelo Genesis 20.

La medición de nitratos en la solución nutritiva se realizó pasando un día con el equipo HORIBA Modelo LAQUATWIN B-743. Se realizaron mediciones del contenido de nitrato en el medio de cultivo antes de realizar la cosecha de algas y posterior a la aplicación de la solución nutritiva, esto con el fin de mantener concentraciones estables durante todas las fases del cultivo (100 ppm N, 1 mL⁻¹ de Nitrofoska). La medición del contenido de nitratos fue considerada como indicador para aplicación nutritiva en caso de requerir. Se realizaron 6 cosechas con espaciamientos de 7 días y con un tiempo total de 60 días.

El consumo de agua se midió diariamente en cada unidad fotobiorreactora, para ello se aforó el tanque de solución nutritiva al inicio del día, al finalizar la tarde se añadió agua hasta la línea de aforo. Para la medición del consumo de agua se consideró las horas del día (Desde 6h hasta 18h) y las horas de la noche (Desde 18h05 hasta 6h00).

En la Figura 1 se muestran los resultados de la concentración de CO₂ en los tratamientos aplicados. Se ajustó su suministro hacia las unidades fotobiorreactoras con el fin de cumplir con las concentraciones establecidas en el ensayo, se puede observar que las concentraciones de CO₂ en el interior de los subpaneles de las unidades fotobiorreactoras (C2R: 527±15, C3R: 1001±32 y C4R: 1504±26ppm) se encuentran dentro de los rangos establecidos de los tratamientos a analizar (C2: 500 ppm, C3:1000 ppm y C4: 1500 ppm). El tratamiento que no se inyecta gases de combustión (C1), en las mediciones previas

tiene una concentración de 406 ± 27 ppm de CO_2 ; si bien, fuera del invernadero (en el ambiente) es de 349 ± 14 ppm de CO_2 , este incremento se debe a que dentro del invernadero exista una ligera concentración de gases por el ambiente creado.

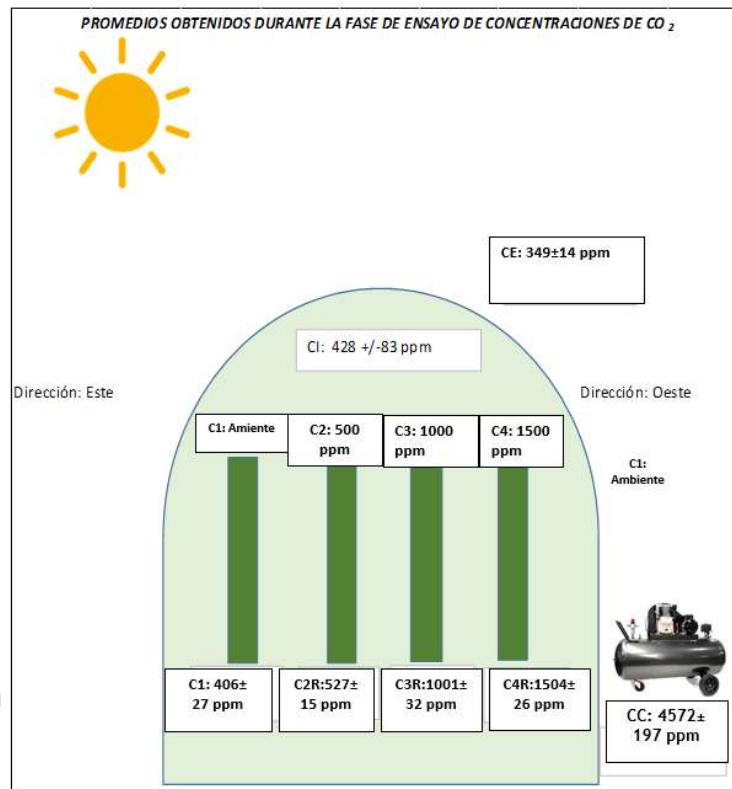


Figura 1. Promedio de la concentración de gases en los diferentes tratamientos realizados con la microalga *Scenedesmus* sp. C1 es la concentración de CO_2 en el tratamiento no enriquecido con este gas, CI es la concentración en el invernadero, CC es la concentración de gases a la salida del compresor y CE es la concentración de CO_2 en el exterior del invernadero. C2, C3 y C4 son las concentraciones que se pretendían obtener y C2R, C3R y C4R son las concentraciones de CO_2 reales para los diferentes tratamientos.

Las microalgas se recolectaron de la lámina textil por raspado previo a la suspensión del suministro de la solución nutritiva, inmediatamente se retomó el ciclo de suministro de la solución

nutritiva. Una muestra de 40 ml de la cosecha se centrifugó con el fin de disminuir el agua contenida en el medio, posteriormente se deshidrató a 40°C hasta mantener peso constante. Para el ensayo de concentraciones de nutrientes se realizaron 7 cosechas continuas y para la concentración de gases de combustión se evaluaron 6 cosechas. Se estableció un espacio de 15 días tras la siembra de microalgas para mantener un crecimiento estable en la unidad fotobiorreactora y en lo posterior se colectó cada 7 días.

3.2.4 Análisis estadístico

Con el fin de evaluar el efecto de los tratamientos de CO₂ y dosis de nutrientes en paneles laminares sobre el pH, conductividad eléctrica, absorbancia, sales, consumo de agua y producción de microalgas se realizó un ANOVA para todas las variables analizadas. Previo al ANOVA se comprobó la normalidad mediante la prueba de *Shapiro-Wilks* y la homogeneidad de varianzas con la prueba de *Levene*. En todos los ensayos en donde se detectaron diferencias significativas se utilizó la prueba *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$) y los datos se procesaron con el software estadístico R.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Concentración de nutrientes

En este apartado se muestran el efecto de la aplicación de 4 dosis de nutrientes sobre distintos parámetros. Como se puede observar (figura 2) los tratamientos, en los que aplicaron distintas dosis de nutrientes, no afectaron a la concentración de CO₂, lo cual revela que una mayor dosis de nutrientes no conlleva un mayor consumo de CO₂. El promedio obtenido durante todo el ensayo para cada dosis de nutriente fue de D1: 358,9±12,58 ppm; D2: 358,8±12,61ppm; D3: 359,04±12,77 ppm y D4: 359,04±12,78 ppm de CO₂.

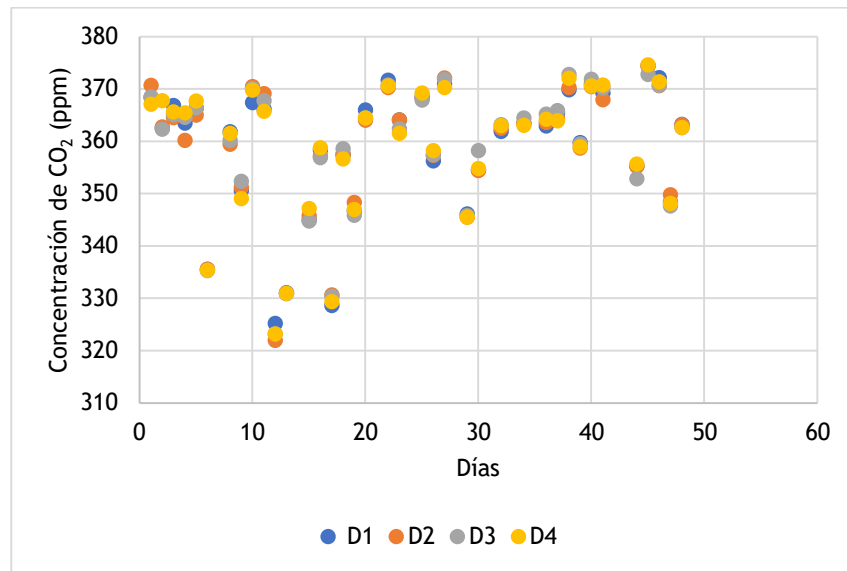


Figura 2. Concentración promedio de CO₂ de los 4 subpaneles de la unidad fotobiorreactora (D1: 100 mgL⁻¹; D2: 200 mgL⁻¹; D3: 300 mgL⁻¹; D4: 400 mgL⁻¹ de N)

Concentración de nitratos

En la figura 3 se muestra la evolución del contenido en nitratos en la solución nutritiva para los cuatro tratamientos de nutrientes aplicados. En la dosis D1 se puede apreciar que la aplicación de nutriente en el medio de cultivo permite mantener estable la concentración en torno a 100 ppm N. Por otra parte, en los tratamientos D2, D3 y D4 se puede observar la disminución del contenido de nitratos.

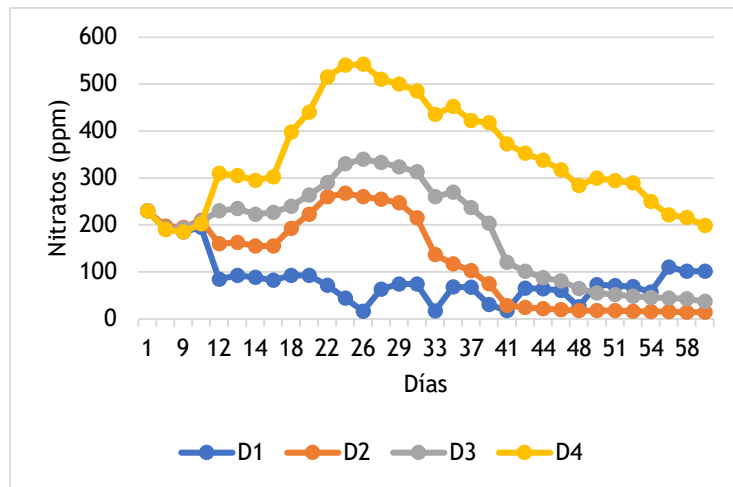


Figura 3. Contenido de nitratos en la solución nutritiva para cada una de las dosis aplicadas (D1: 100 ppm; D2: 200 ppm; D3: 300 ppm; D4: 400 ppm de N)

Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) en las cosechas se mantiene diferenciada en cada tratamiento y esto debido a las concentraciones distintas de nutriente (Tabla 1). A medida que transcurre el tiempo la CE disminuye gradualmente para las dosis D2, D3 y D4, no siendo así para D1 en donde la CE se incrementa. Se observa por tanto que inicialmente la CE tiene una relación directa y positiva con la dosis de nutriente aplicada. El tratamiento D1 recibe Nitrofoska con el fin de mantener una concentración de 100 mgL^{-1} de N (Tabla 1). En general la dosis D4 presenta una CE significativamente superior a D2 y D3.

Tabla 1. Conductividad eléctrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) por cosecha semanal. Para cada cosecha tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas (Tukey $p < 0,05$)

DOSIS	COS 1	COS 2	COS 3	COS 4	COS 5	COS 6	COS 7
D1	516,10 ^d	395,09 ^c	503,14 ^c	628,76 ^b	787,25 ^{ab}	874,00 ^a	1083,12 ^a
D2	950,02 ^c	824,43 ^b	637,14 ^{bc}	518,46 ^b	574,29 ^b	556,01 ^b	663,07 ^c
D3	1353,51 ^b	1161,55 ^b	931,57 ^b	727,50 ^b	695,13 ^{ab}	639,14 ^b	713,07 ^{bc}
D4	1774,28 ^a	1636,88 ^a	1350,53 ^a	1163,72 ^a	997,15 ^a	819,54 ^a	773,43 ^b

COS: Cosechas semanales; D1: 100 mgL^{-1} ; D2: 200 mgL^{-1} ; D3: 300 mgL^{-1} ; D4: 400 mgL^{-1} de N

Producción de microalgas

En relación a la producción de materia seca se observa (Tabla 2) que los valores más elevados en todas las cosechas se encuentran en el tratamiento de 100 mgL^{-1} de N (D1), en este tratamiento en la cosecha 5 (COS5) existe la mayor producción (2,95 $\text{gm}^{-2}\text{d}^{-1}$). En las cosechas de las semanas 1 y 2 no se encuentran diferencias significativas entre las dosis empleadas. Sin embargo, la dosis D1, en las cosechas 3, 4 y 5, presenta una producción significativamente superior que el resto de tratamientos. La mejor producción por una parte y el menor coste asociado a la dosis más baja nos lleva a concluir que éste es el tratamiento idóneo. De tal manera que el rendimiento durante las 7 cosechas evaluadas evidenció valores elevados para las dosis 1 mientras que, para el resto de dosis los valores fueron menores. El máximo rendimiento fue para la dosis D1 en la semana 5 de la cosecha

Si bien en las dosis D2, D3 y D4 presenta concentraciones de nutrientes superiores a D1 esto no beneficia en la producción de materia seca, a tal punto que el rendimiento es estadísticamente igual para estos tratamientos y con una disminución gradual en las cosechas posteriores. Nuestros resultados muestran que la menor dosis aplicada da lugar a una mayor producción con lo cual para optimización el coste de producción hay que utilizar la dosis más baja.

Tabla 2. Producción de materia seca ($\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$) en las cosechas de las algas unicelulares realizadas durante 7 semanas. Para cada cosecha los tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas (Tukey $p < 0,05$).

Dosis	COS 1	COS 2	COS 3	COS 4	COS 5	COS 6	COS 7
D1	1,37 ^a	1,84 ^a	2,17 ^a	2,67 ^a	2,95 ^a	2,28 ^a	1,64 ^a
D2	1,22 ^a	1,35 ^a	1,12 ^b	1,50 ^{ab}	1,21 ^b	1,21 ^{ab}	0,94 ^a
D3	1,11 ^a	1,07 ^a	1,00 ^b	0,95 ^b	0,90 ^b	1,21 ^{ab}	1,13 ^a
D4	1,32 ^a	1,28 ^a	0,97 ^b	0,87 ^b	0,89 ^b	0,85 ^b	0,95 ^a

COS= Cosechas semanales; D1: 100 ppm; D2: 200 ppm; D3: 300 ppm; D4: 400 ppm de N

El promedio de las 7 cosechas realizadas determina diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) para las dosis, la prueba tukey (0.05) establece que el tratamiento promedio con mayor producción es D1 siendo significativamente diferente a D2, D3 y D4.

3.3.2 Optimización de la concentración de gases

En este apartado se estudia el efecto de los tratamientos, con diferentes concentraciones de CO_2 , sobre los parámetros analizados.

pH

El efecto de la concentración del CO_2 sobre el pH de la solución nutritiva se muestra en la Figura 4. Los valores de pH en los diferentes tratamientos se encuentran en un rango entre 8,1 y 8,4 durante la fase de crecimiento. Sin embargo, en las fases posteriores este rango es mucho mayor fluctuando enormemente entre los días de medida. En relación al efecto de los tratamientos, encontramos que generalmente el tratamiento de CO_2 de 1000 ppm muestra los valores de pH más bajos en comparación con el tratamiento control y el de 1500 ppm en las fases 3, 4, 5 y 6, siendo el tratamiento de 500 ppm el que habitualmente presenta unos niveles de pH mayores en comparación con el de 1000 ppm de CO_2 (Anexo 6).

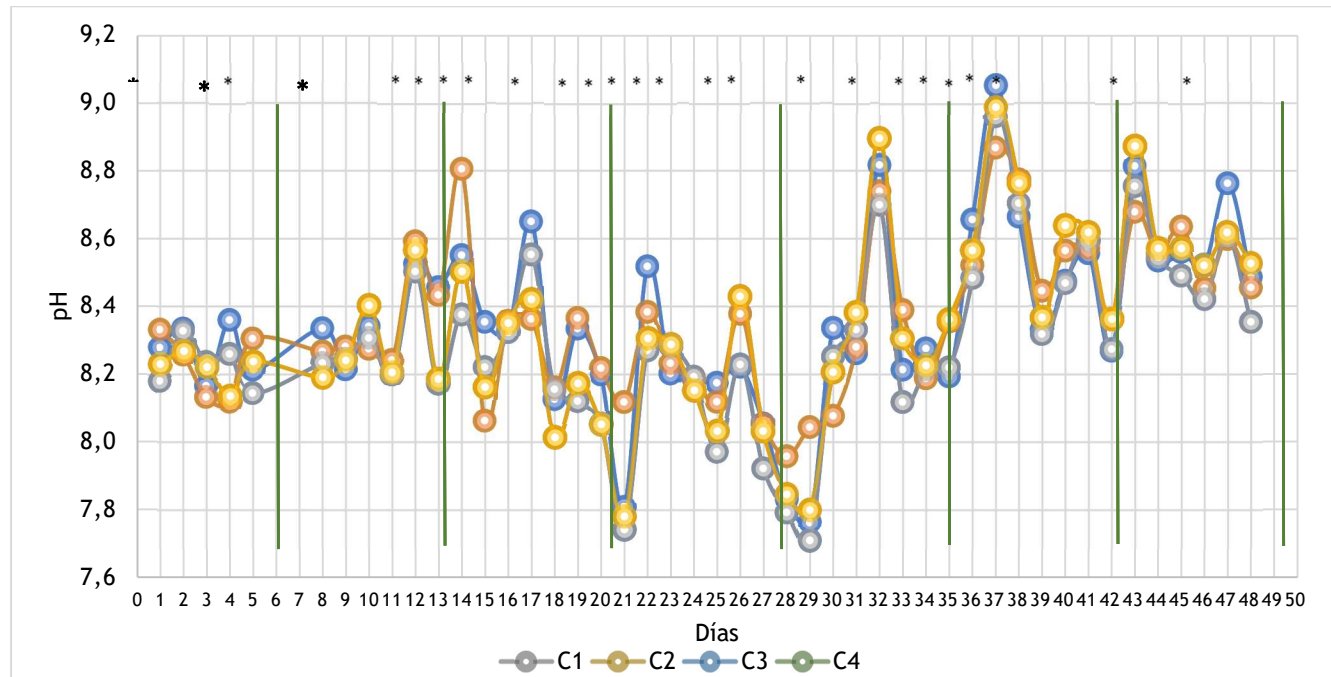


Figura 4. Evolución del pH en la solución nutritiva en función de la concentración de CO₂ durante las diferentes fases del cultivo laminar (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂). Las líneas verticales de color verde indican los momentos de la cosecha y los asteriscos señalan diferencias significativas (Tukey p<0,05) entre las concentraciones de CO₂.

Conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales

La conductividad eléctrica y la concentración de sólidos totales en la solución nutritiva mostraron un comportamiento similar en todos los tratamientos en cuanto a la tendencia temporal global y tras la cosecha, así como en la respuesta a la mayoría de los tratamientos. Estos dos parámetros (Figura 5a y b) muestran un claro incremento a medida que transcurren las diferentes cosechas, comenzando con unos valores de CE próximos a $500 \mu\text{S cm}^{-1}$ y finalizando con unos valores de casi $800 \mu\text{S cm}^{-1}$ o superiores a mil en función de si medimos antes o después de la última cosecha respectivamente, lo que es indicativo de una relación directa entre la concentración de nutrientes y la conductividad eléctrica, descrita previamente. Tras la cosecha se adiciona solución nutritiva con lo cual se incrementa la conductividad eléctrica, este parámetro descende con el tiempo debido a que las microalgas durante su desarrollo absorben los nutrientes del medio. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos de la CE.

Los tratamientos afectaron significativamente a la conductividad eléctrica y a la concentración de sólidos disueltos totales durante la primera, segunda y tercera cosecha de tal forma que el tratamiento de CO_2 de 1000 ppm (C3) resultó tener valores significativamente más altos que el resto. Sin embargo, en la fase 6 fue el tratamiento de CO_2 de 500 ppm (C2) presentó una CE significativamente mayor al tratamiento con concentración de CO_2 ambiental (C1) (Anexo 6).

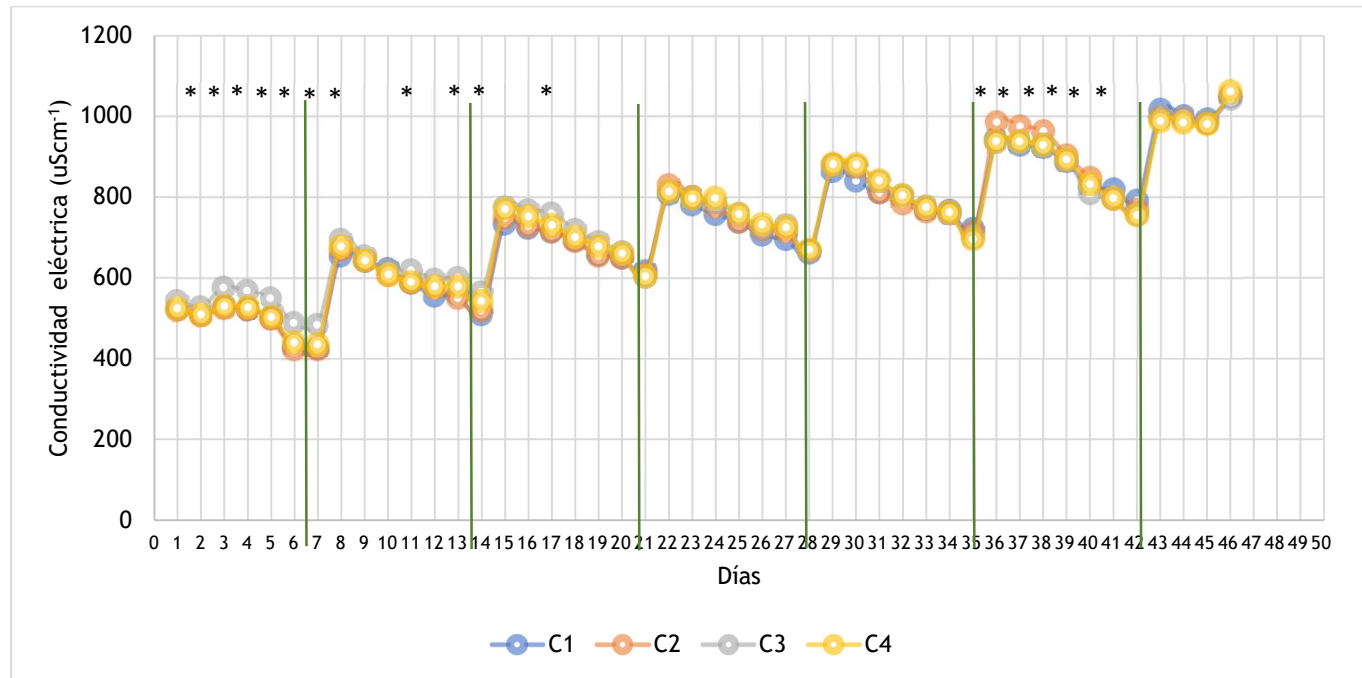


Figura 5a. Evolución de Conductividad eléctrica (uScm⁻¹) en la solución nutritiva en función de la dosis de CO₂ durante las diferentes fases del cultivo laminar (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂). Las líneas verticales de color marrón indican los momentos de la cosecha y los asteriscos señalan diferencias significativas (Tukey p<0,05).

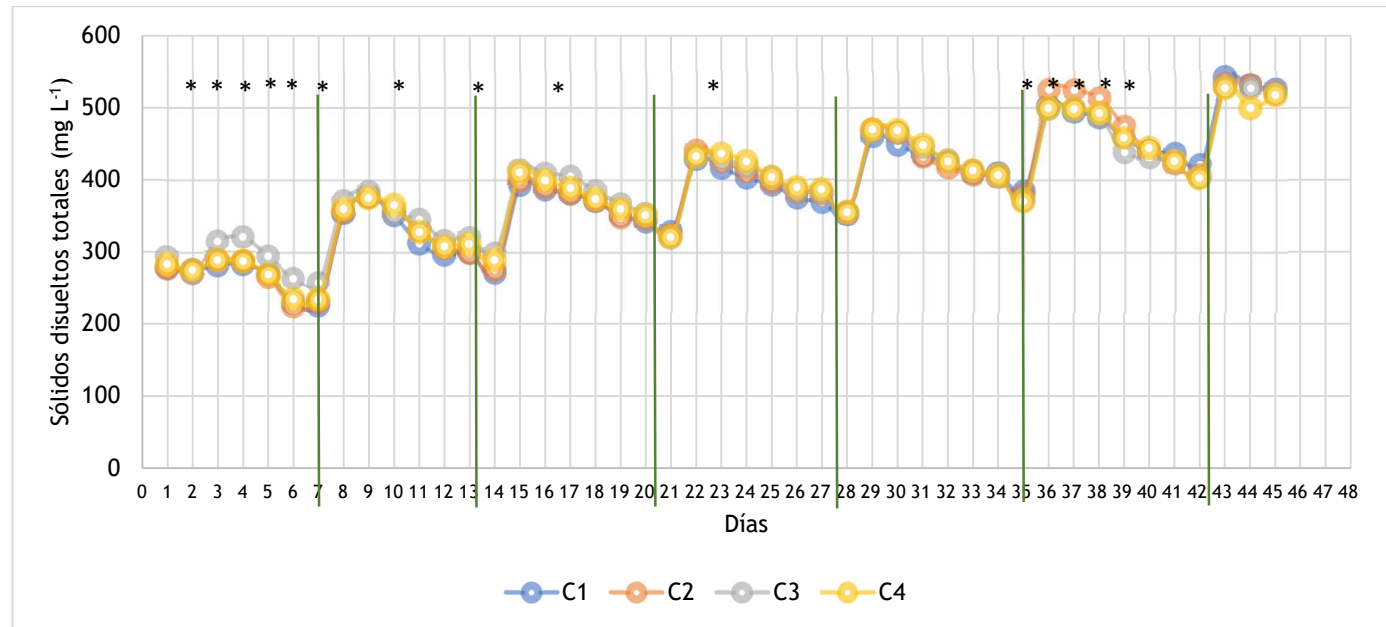


Figura 5b. Evolución de sólidos disueltos totales (mgL⁻¹) en la solución nutritiva en función de la dosis de CO₂ durante las diferentes fases del cultivo laminar (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂). Las líneas verticales de color marrón indican los momentos de la cosecha y los asteriscos señalan diferencias significativas (Tukey p<0,05).

Sales

En la Figura 6 se observa que los niveles de sales siguen en general un patrón similar a los encontrados para la conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales en relación a su incremento desde el principio al final del ensayo y entre cosechas. La respuesta de los niveles de sales en las fases 1, 2 y 6 también resultaron similares a las variables previamente mencionadas. Sin embargo, y a diferencia de lo ocurrido con la conductividad eléctrica y sólidos disueltos totales, nos encontramos con que en las cosechas o fases 4 y 5 si obtenemos diferencias significativas entre tratamientos (Anexo 6).

Absorbancia

Con este parámetro se pretendió llevar a cabo el seguimiento de la mayor o menor presencia de algas en la solución nutritiva. En la Figura 7 se puede apreciar una evolución que se repite tras realizar la cosecha. En la fase de crecimiento se observó una tendencia gradual de incremento del nivel de absorbancia a medida que pasa el tiempo, si bien es cierto el coeficiente de variación es alto esto se puede deber a que las mediciones de absorbancia en la mayoría de los casos son menores a 0,03 y cualquier variación mínima afecta drásticamente en su variabilidad.

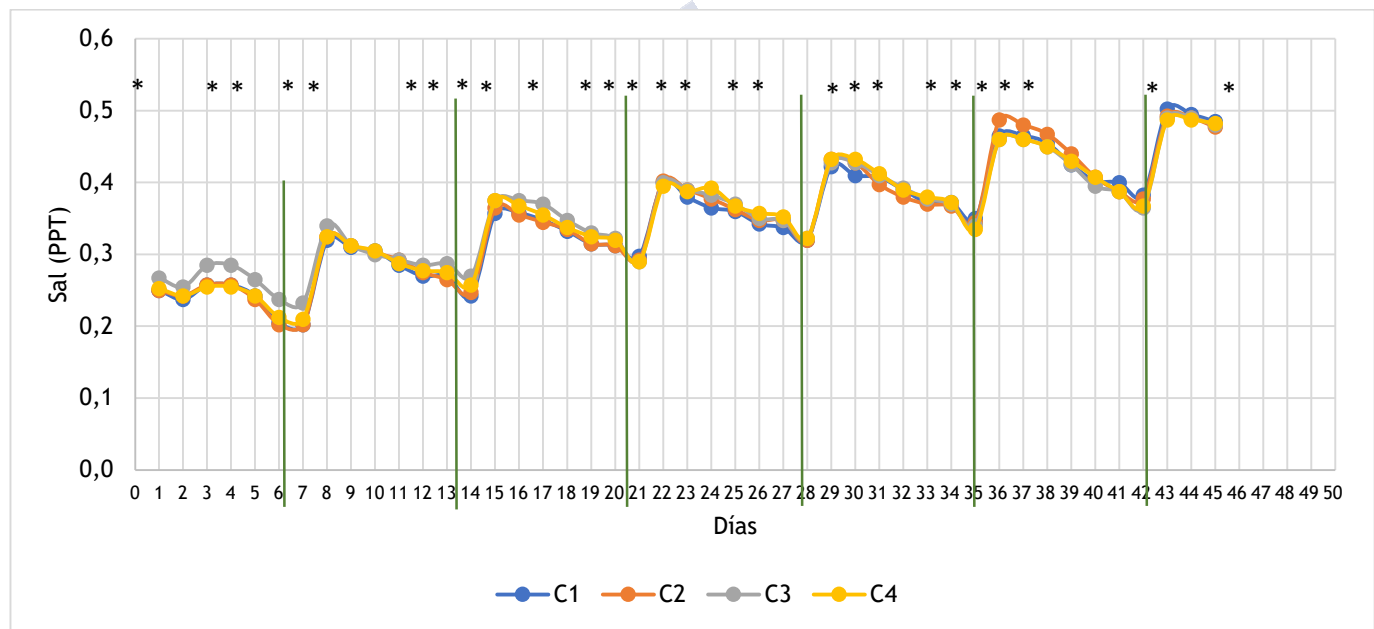


Figura 6. Comportamiento del contenido de Sal en la solución nutritiva en función de la dosis de CO₂ durante las diferentes fases del cultivo laminar (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂). Las líneas verticales de color marrón indican los momentos de la cosecha y los asteriscos señalan diferencias significativas (Tukey, p<0,05)

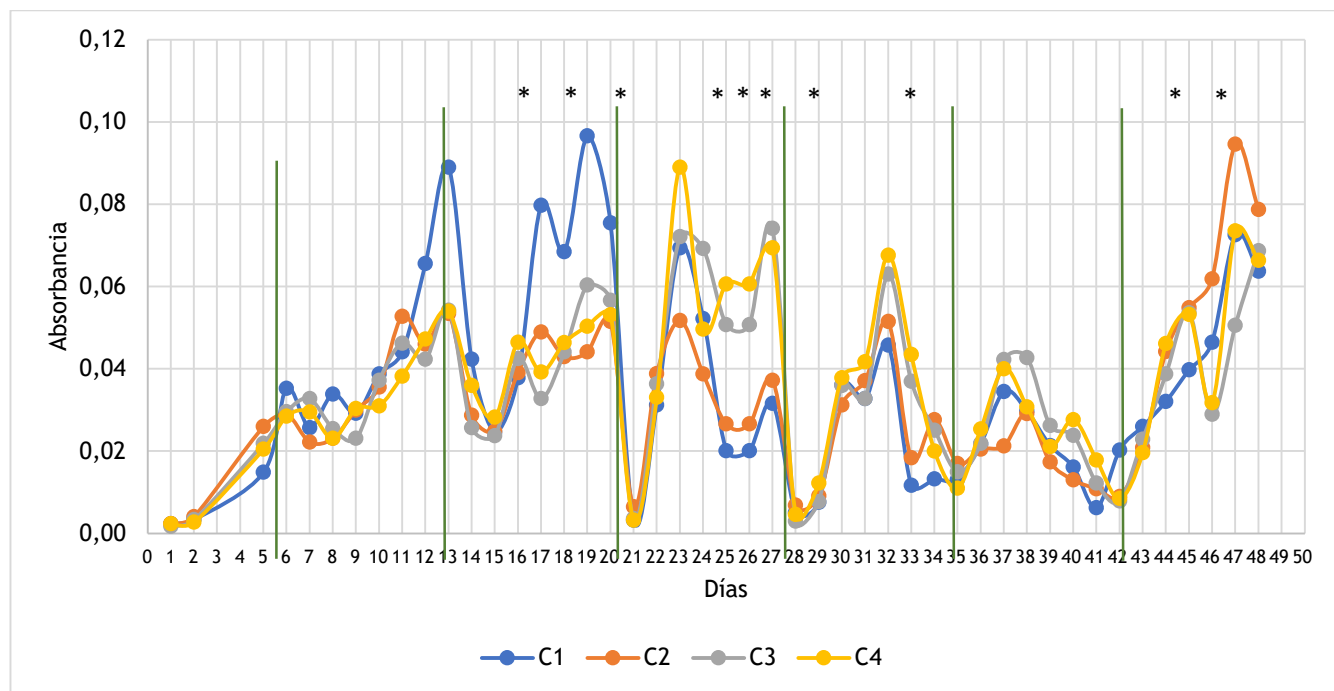


Figura 7. Evolución de la absorbancia en las distintas fases de crecimiento celular y tratamientos (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂)

Consumo de agua

El consumo de agua está relacionado con la temperatura en el interior del invernadero, de ahí las fluctuaciones tanto en el día como en la noche, notándose menores variaciones de consumo de agua por la noche entre tratamientos (Figura 8 y Tabla 3).

En la tabla 3 se muestra el consumo total de agua tanto en el día como noche en los tratamientos aplicados. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en el día y noche. De esta manera se puede decir que la variación en la concentración de gases de combustión no incide en el consumo de agua del sistema de recirculación.

Tabla 3. Consumo promedio de agua durante el ensayo ($L h^{-1} m^{-2}$) entre tratamientos

En el día	C1	C2	C3	C4
Media	0,106	0,093	0,093	0,094
En la noche	C1	C2	C3	C4
Media	0,129	0,124	0,125	0,121

C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂

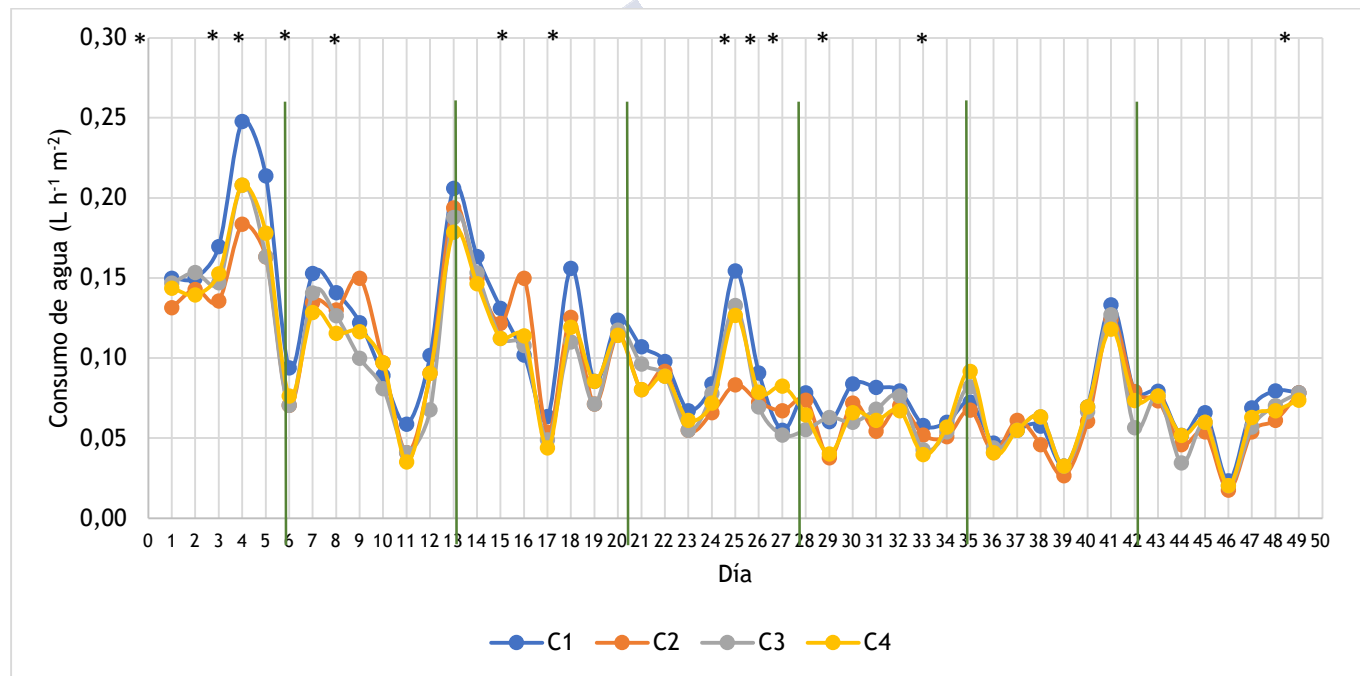


Figura 8a. Evolución del consumo (L h⁻¹ m⁻²) de agua en el día por tratamientos (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂)

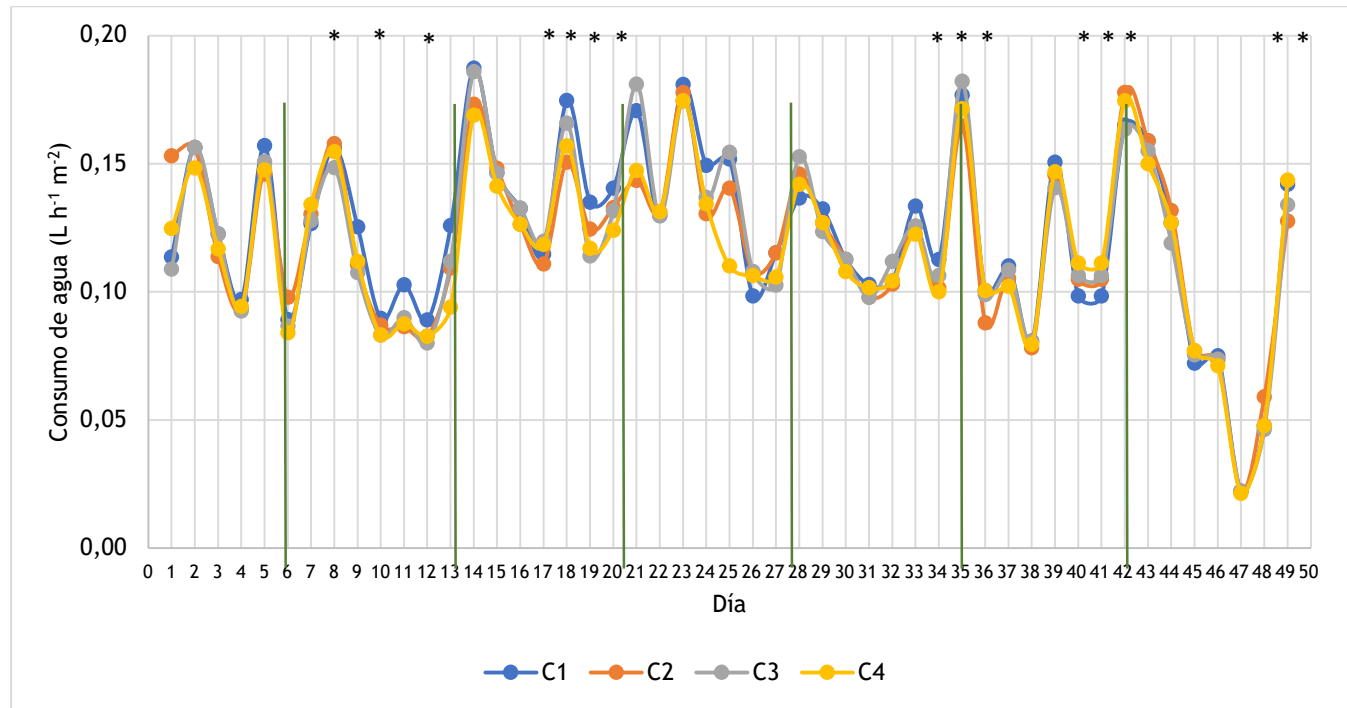


Figura 8b. Evolución del consumo ($L h^{-1} m^{-2}$) de agua en el día y la noche por tratamientos (C1= ambiente, C2= 500 ppm CO_2 , C3= 1000 ppm CO_2 , C4= 1500 ppm CO_2)

Producción

La Tabla 4 presenta los resultados de producción de materia seca ($\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$) en el volumen cosechado para cada tratamiento. Los resultados del ANOVA no muestran diferencias significativas en el contenido en materia seca entre las distintas dosis de CO_2 aplicadas por cada cosecha realizada.

Tabla 4. Producción en Materia seca en $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$. Para cada cosecha los tratamientos sin letras indica que no presentan diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$)

Concentración CO_2	COS 1	COS 2	COS 3	COS 4	COS 5	COS 6
C1	2,64	3,64	3,71	4,33	4,44	2,94
C2	2,42	2,79	4,25	4,33	4,77	2,91
C3	2,29	2,66	4,08	4,72	4,92	3,12
C4	2,24	3,43	3,90	4,89	4,69	3,10

COS= Cosecha, C1= ambiente, C2= 500 ppm CO_2 , C3= 1000 ppm CO_2 , C4= 1500 ppm CO_2

La producción de materia seca en todas las cosechas realizadas no muestra diferencias significativas entre los tratamientos lo cual pone de relieve que el incremento de la concentración de CO_2 no mejora ni empeora la producción en las cosechas desarrolladas durante el experimento.

En las cosechas 3, 4 y 5 se puede observar un incremento en la producción, esto se debe a que la lámina de la unidad fotobiorreactora forma una película microalgal compacta lográndose llegar a la máxima producción. En especial en la cosecha 5 el valor para las concentraciones C1, C2 y C3 es el mayor comparando con el resto de cosechas. En la sexta cosecha existe un decremento en el rendimiento de materia seca, esto puede deberse a que la solución nutritiva tiene una elevada conductividad eléctrica (sobre los $1000 \mu\text{scm}^{-1}$) lo cual puede provocar que disminuya el crecimiento de *Scenedesmus* sp (Anexos 7 y 8). Los resultados obtenidos son ratificados por Huang y col. (2016) en ensayos sobre la influencia del CO_2 en el crecimiento celular de

Chlorella en un biofilm, observado que el aumento de CO₂ en la cámara de cultivo no significa un incremento en la tasa de crecimiento de esta especie. Por otra parte, d en ensayos realizados por Zhao y col (2015) la biomasa de *Chlorella* fue inversa al incremento de concentración de CO₂.

En resumen, podemos afirmar que, si bien la producción de microalgas no disminuyó, lo que sí es cierto es que se mantuvo estable ante el incremento de la concentración de gases de combustión.

pH en las cosechas realizadas

En la Tabla 5 se aprecia que existen diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) en relación al pH en todas las cosechas realizadas con excepción de la cosecha 3 (COS3) en donde las diferencias son significativas al 0,1%.

Tabla 5. Variación del pH por cosecha y concentración de CO₂. Para cada cosecha si los tratamientos tienen la misma letra no presentan diferencias significativas (Tukey $p < 0,05$)

	COS 1	COS 2	COS 3	COS 4	COS 5	COS 6
Concentración CO ₂						
C1	7,70 ^{ab}	7,85 ^a	7,69 ^a	7,88 ^a	7,93 ^{ab}	7,80 ^b
C2	7,77 ^a	7,74 ^a	7,64 ^{ab}	7,90 ^a	8,04 ^a	7,92 ^a
C3	7,65 ^b	7,75 ^a	7,66 ^{ab}	7,70 ^b	7,82 ^b	7,78 ^b
C4	7,66 ^b	7,60 ^b	7,60 ^b	7,81 ^{ab}	7,97 ^a	7,77 ^b

COS= Cosechas realizadas; C1= ambiente, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂

El comportamiento del pH en las tres primeras cosechas se mantiene ligeramente estable, posterior a los cual existe un incremento en su valor, disminuyendo en la última cosecha, este decremento coincide con el registrado en la materia seca.

3.4 Conclusiones

Las algas unicelulares en la actualidad se están utilizando para un sinnúmero de aplicaciones y cada vez más su producción pasa de ensayos piloto con el fin de optimizar su producción a nivel industrial dado que el aumento de la demanda de los productos derivados de las microalgas, especialmente por sus componentes funcionales.

La producción de *Scenedesmus* en un sistema de fotobiorreactores fue superior para la menor dosis de Nitrofoska (100 mg L^{-1} de N) frente a los tratamientos de mayor concentración (200, 300 y 400 mg L^{-1} de N), lo cual podría estar relacionado con el aumento de la conductividad eléctrica de la solución nutritiva.

La conductividad eléctrica y el consumo de agua no mostraron diferencias entre los tratamientos con diferentes dosis de CO_2 .

Las concentraciones de CO_2 más elevadas (1000 y 1500 ppm) disminuyeron el pH de la solución nutritiva, sin que este hecho provoque diferencias en la producción de *Scenedesmus* entre los tratamientos.

El sistema implementado permitió captar gases de combustión a una concentración máxima de 1500 ppm de CO_2 sin disminuir la producción de biomasa.

La producción de biomasa de *Scenedesmus* a nivel industrial podría ser empleada para la producción de bioestimulantes con el fin de disminuir el uso de fertilizantes convencionales y llevar a cabo unas prácticas agrícolas más sostenibles.

3.5. Referencias bibliográficas

- Blair, M. F., Kokabian, B., & Gude, V. G. (2014). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 665-674. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.005>
- Chegukrishnamurthi, M., Shahabazuddin, M., Sreevathsan, S., Sarada, R., & Narayan, S. (2020). Ozonation as non-thermal option for bacterial load reduction of *Chlorella* biomass cultivated in airlift photobioreactor 1230. *Journal of Cleaner Production*, 276(123029). doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123029>
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., . . . Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229, 53-62. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>.
- Huang, Y., Xiong, W., Liao, Q., Fu, Q., Xia, A., Zhu, X., & Sun, Y. (2016). Comparison of *Chlorella vulgaris* biomass productivity cultivated in biofilm and suspension from the aspect of light transmission and microalgae affinity to carbon dioxide. *Bioresource Technology*, 122. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.099>
- Kumar, A., & Bera, S. (2020). Revisiting nitrogen utilization in algae: A review on the process of regulation and assimilation. *Bioresource Technology Reports*, 12. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100584>.
- Lee, E., & Zhang, Q. (2016). Integrated co-limitation kinetic model for microalgae growth in anaerobically digested municipal sludge centrate. *Algal Research*, 8, 15-24. doi:[doi:10.1016/j.algal.2016.05.019](https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.019)

- Lu, W., Alam, A., Liu, S., Xu, J., & Parra, R. (2020). Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO₂. *Science of The Total Environment*, 716(135247). doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135247.
- Nagi, M., He, M., Li, D., Gebreluel, T., Cheng, B., & Wang, C. (2020). Utilization of tannery wastewater for biofuel production: New insights on microalgae growth and biomass production. *Scientific Reports*, 10(1). doi:doi:10.1038/s41598-019-57120-4
- Sharma, R., Singh, G., & Sharma, V. (2011). Comparison of different media formulations on growth, morphology and Chlorophyll content of green alga, *Chlorella vulgaris* 2 (2). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 509-516.
- Shayesteh, H., Vadiveloo, A., Bahri, P., & Moheimani, N. (2021). Can CO₂ addition improve the tertiary treatment of anaerobically digested abattoir effluent (ADAE) by *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta)? *Algal Research*. doi:https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102379.
- Young, Y., Kumar, A., Eui, M., Seok, W., & Jun, S. (2019). Microalgae Bioenergy with Carbon Capture and Storage (BECCS): An emerging sustainable bioprocess for reduced CO₂ emission and biofuel production. *Bioresource Technology Reports*, 7. doi:https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100270.
- Zhao, Zhao, B., Su, Y., Zhang, Y., & Cui, G. (2015). Carbon dioxide fixation and biomass production from combustion flue gas using energy microalgae. *Energy*, 89, 347-357. doi:https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.05.123.

Capítulo 4. CULTIVO DE LECHUGA Y BIOESTIMULACIÓN CON *Scenedesmus*

Resumen

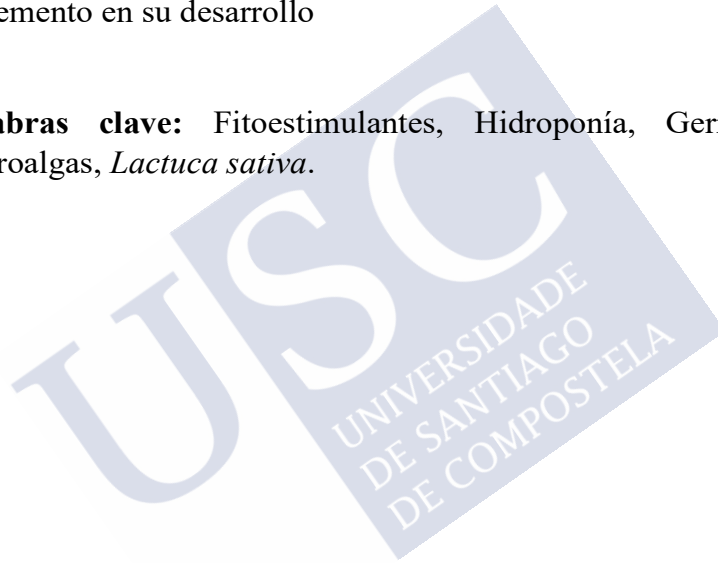
Las algas unicelulares constituyen una alternativa viable como reemplazo de los fertilizantes químicos, ya sea como bioestimulantes o como forma de aporte de nutrientes a las plantas. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto, sobre distintos parámetros biométricos, de la adición *Scenedesmus* sp como bioestimulante en diferentes etapas (germinación, en la fase de desarrollo de plántulas y en un medio líquido hidropónico) del ciclo de producción de lechuga (*Lactuca sativa*).

En el ensayo de germinación se evaluaron distintas dosis de microalgas (2×10^7 , 4×10^7 y 6×10^7 células ml^{-1}) en semillas de lechuga incubadas a 15, 20 y 25°C mientras que en el ensayo de crecimiento de plántulas en bandejas en invernadero se estudió el efecto de la aplicación de *Scenedesmus* sp ($0,25 \times 10^7$, $0,5 \times 10^7$, $0,75 \times 10^7$, 1×10^7 células ml^{-1}) sobre el desarrollo de producción de plántulas de lechuga con y sin adición de fertilizantes. En el cultivo hidropónico se analizó el aporte de *Scenedesmus* sp como bioestimulante (0, 40, 80 y 120×10^4 células ml^{-1}) en el cultivo de lechuga durante 25 días.

Los resultados de la aplicación de distintas dosis de *Scenedesmus* sp. no mostraron efecto alguno sobre el porcentaje de germinación

tanto en placa como en las bandejas, no obstante, la longitud de la radícula, en ambos ensayos fue significativamente mayor en todos los tratamientos con *Scenedesmus* sp frente al tratamiento sin microalgas. En relación al efecto de la temperatura sobre la germinación, los resultados indican que la mejor temperatura para el crecimiento de la planta es de 20°C y 25°C frente a los 15°C. Por otra parte, la aplicación de las distintas dosis de concentraciones de *Scenedesmus* sp en cultivo hidropónico incrementaron significativamente el peso de la parte aérea de la lechuga frente al tratamiento sin adición de microalgas. Por todo ello, se puede determinar que el uso de concentraciones de microalgas vivas durante el ciclo de desarrollo de lechuga hidropónica provoca un incremento en su desarrollo

Palabras clave: Fitoestimulantes, Hidroponía, Germinación, Microalgas, *Lactuca sativa*.



Abstract

Single-celled algae are a viable alternative as a replacement for chemical fertilizers, either as biostimulants or as a form of nutrient supply to plants. The objective of this research was to evaluate the effect, on different biometric parameters, of the addition of *Scenedesmus* sp as a biostimulant in different stages (germination, in the seedling development phase and in a hydroponic liquid medium) of the lettuce production cycle (*Lactuca sativa*).

In the germination test, different doses of microalgae (2×10^7 , 4×10^7 and 6×10^7 cells ml^{-1}) were evaluated in lettuce seeds incubated at 15, 20 and 25 ° C while in the seedling growth test in greenhouse trays it was studied of the effect of the application of *Scenedesmus* sp (0.25×10^7 , 0.5×10^7 , 0.75×10^7 , 1×10^7 cells ml^{-1}) on the development of lettuce seedling production with and without the addition of fertilizers. In the hydroponic culture, the contribution of *Scenedesmus* sp as biostimulant (0, 40, 80 and 120 x 10⁴ cells ml^{-1}) was analyzed in the lettuce culture for 25 days.

The results of the application of different doses of *Scenedesmus* sp. They did not show any effect on the germination percentage both on the plate and on the trays, however, the radicle length, in both tests, was significantly greater in all the treatments with *Scenedesmus* sp compared to the treatment without microalgae. Regarding the effect of temperature on germination, the results indicate that the best temperature for plant growth is 20 ° C and 25 ° C compared to 15 ° C. On the other hand, the application of different doses of *Scenedesmus* sp concentrations in hydroponic culture significantly increased the weight of the aerial part of the lettuce compared to the treatment without the addition of microalgae. Therefore, it can be determined that the use of concentrations of live microalgae during the development cycle of hydroponic lettuce causes an increase in its development.

Keywords: Phytostimulants, Hydroponics, Germination, Microalgae, *Lactuca sativa*.

4.1 Introducción

La elevada capacidad productiva de las microalgas está potenciando su empleo en diferentes ámbitos. El uso de materiales biológicos provenientes de microalgas está permitiendo que dentro del desarrollo agrícola se incorporen productos amigables con el medio ambiente, proporcionando alternativas para suplir las necesidades nutricionales de las plantas y disminuir el uso de fertilizantes químicos, a través de la mejora del uso de los recursos. Las algas unicelulares pueden emplearse como bioestimulantes para mejorar el uso de recursos como la fertilización en los cultivos hidropónicos. Se definen como bioestimulantes vegetales a cualquier sustancia o microorganismo que se aplica a las plantas con el objeto de mejorar la eficiencia nutricional y la tolerancia al estrés abiótico (Jardin, 2015).

El uso de algas frescas como fuente de materia orgánica por parte de los agricultores es una práctica extendida en determinadas regiones, sin embargo, un aspecto novedoso y de menor aplicación es el uso como bioestimulante sobre la germinación de las semillas, y el crecimiento y el desarrollo de las plantas en cultivos hidropónicos. Estos efectos bioestimulantes en las plantas están asociados principalmente con cambios hormonales (Craigie, 2011).

Ciertos bioestimulantes de origen natural usados en agricultura son derivados de algas y basan su éxito en el contenido de hormonas o nutrientes de los cultivos acuáticos, para ser aplicados en los cultivos agrícolas. Estas sustancias, en pequeñas concentraciones, activan el metabolismo vegetal, de esta forma se logra mejorar la longitud de brotes, cobertura foliar, y el crecimiento del sistema radicular. En diversos estudios se muestra el efecto estimulante de los extractos de diferentes algas sobre la germinación (Hernández-Herreray col., 2014; Garcia-González y Sommerfeld, 2016; Karthik y col., 2020; Shamia y col., 2020; Supraja y col., 2020).

La hidroponía nace como un sistema de cultivo sin suelo para producir alimentos y sobre todo para obtener productos sanos y libres de contaminación. Se considera como una actividad amigable con el ambiente pues en este proceso se regulan de forma precisa las necesidades de agua, suelo y nutrientes. Pero el uso de fertilizantes químicos en la nutrición hace que la actividad no sea sostenible en su totalidad. Estudios realizados por Zhang y col (2017) permiten confirmar el desarrollo de cultivos hidropónicos y microalgas en donde comparten la luz, agua y nutrientes.

El cultivo en hidroponía es una alternativa que permite producir diferentes especies de plantas cubriendo todas las necesidades de los cultivos como son la luz, el agua, la temperatura y disponibilidad de nutrientes (Beltrano y Giménez, 2015). Es muy importante tener en cuenta que el consumo y coste del agua y fertilizantes químicos en este sistema disminuye gracias a la recirculación de la solución nutritiva disponible, obteniendo ahorros de hasta 30%. Existen ejemplos que muestran el éxito de este sistema. Así, bioestimulantes producidos a partir de algas (como Kelpak[®]) fueron evaluados en plantas de *Eucomis autumnalis* bajo condiciones hidropónicas demostrando influir positiva y significativamente en el cultivo, lo que evidencia el enorme potencial que tienen este tipo de bioestimulantes en los cultivos agrícolas (Aremu y col, 2016).

Estudios sobre la producción de microalgas en sistemas hidropónicos dan cuenta de una buena integración simbiótica entre el cultivo y la biomasa algal, tal es el caso del trabajo realizado por Zhang y col (2017) quienes utilizaron el alga *Chorella infusionum* en el cultivo de tomate bajo un sistema hidropónico lográndose un incremento en la biomasa microalgal y del cultivo y demostrando que los cultivos y las microalgas pueden cultivarse estableciéndose simbiosis entre ambas especies.

Existe una respuesta positiva al uso de soluciones de microalgas como bioestimulantes en el desarrollo radicular de distintas hortalizas, tal es el caso del uso de *Scenedesmus quadricuada* y *Chlorella vulgaris* en remolacha (*Beta vulgaris* L.), en este caso los

extractos de microalgas tienen un efecto bioestimulante en sus raíces (Barone y col. 2018).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la adición *Scenedesmus* sp como bioestimulante en las diferentes etapas del ciclo de producción en lechuga: germinación, desarrollo de plántulas y cultivo hidropónico.

4.2 Materiales y métodos

Con el objeto de evaluar la capacidad bioestimulante *Scenedesmus* sp se procedió a la realización de tres experimentos correspondientes a tres fases de desarrollo de lechuga: la fase de germinación, desarrollo de la plántula en bandeja y cultivo hidropónico de planta de lechuga. Estos experimentos se desarrollaron en laboratorio, invernadero de propagación de plantas y en invernadero de hidroponía de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

4.2.1 Germinación y evolución de la plántula en condiciones controladas

El ensayo de germinación consistió en la aplicación de cuatro tratamientos que incluyen tres concentraciones de *Scenedesmus* sp y un testigo (sin aplicación de concentración microalgal), incubadas a tres temperaturas.

Para la obtención del bioestimulante se procedió a un centrifugado (6000 rpm, 5 minutos) de *Scenedesmus* sp procedente del cosechado de los fotobiorreactores tal y como se describe en el capítulo 1, realizando tres lavados y centrifugando, y desechando el sobrenadante. Con el sedimentado se prepararon concentraciones de 2×10^7 (C1), 4×10^7 (C2) y 6×10^7 (C3) células ml^{-1} . Para determinar el número de lavados necesarios se consideró el valor de la conductividad eléctrica del agua desmineralizada utilizada para dicho fin (Anexo 7). Se colocaron 10 semillas de lechuga en caja

Petri entre dos capas de discos de papel filtro previamente humedecido con 1 ml de concentración de microalgas a distintas concentraciones los dos primeros días, al día 4 se eliminó el papel filtro colocado sobre las semillas (Anexo 2). Se utilizaron 3 cámaras de germinación (ING CLIMAS modelo Grow/HR360) a temperaturas de 15, 20 y 25°C (Anexo 2, 3, 4, y 5) en cada una se colocaron 16 cajas Petri. Diariamente se adicionó agua para mantener humedad adecuada y el fotoperiodo fue de 12 horas de iluminación y 12 horas de oscuridad.

Al segundo día de colocadas las semillas en la caja Petri se realizó el conteo de semillas germinadas; posteriormente, al sexto día se realizaron las mediciones de longitud de parte aérea y radicular de la plántula con la ayuda de un calibrador digital. Se midieron las 10 plántulas de cada caja Petri y se obtuvo su promedio.

4.2.2 Producción de plántula de lechuga para posterior trasplante

Se evaluó el efecto de cuatro concentraciones ($0,25 \times 10^7$, $0,5 \times 10^7$, $0,75 \times 10^7$, 1×10^7 células ml^{-1}) de microalga *Scenedesmus* sp (tabla 1) en la producción de plántulas de lechuga a dos grupos de tratamientos sin y con fertilización química (Nitrofoska 1 ml L^{-1} en dos aplicaciones durante el desarrollo de plántula a una dosis de 3 ml por alveolo).

Se emplearon bandejas de germinación de 128 alveolos de material plástico y un sustrato a base de turba (Floragard[®]). En cada alveolo se colocó una semilla de lechuga de la variedad crespa (SAKATA[®]). Se añadió 3 ml de cada una de las concentraciones de *Scenedesmus* sp en cada alveolo de la bandeja de germinación aplicados en superficie con una pipeta de 5 ml. Esta operación se realizó en 7 ocasiones durante 25 días. Todos los tratamientos recibieron un aporte de un estimulante radicular de 2 ml por alveolo (Raizal 400[®] a una concentración de 5 g L^{-1}) a los 5 y 8 días y de calcio

a una dosis de 3 ml L⁻¹ por alveolo (Calcio Wuxal® a una concentración de 2 mlL⁻¹) a los 12 y 18 días, según práctica habitual en los viveros de plántula de la zona. Para el riego se sumergió toda la bandeja en agua a una profundidad de 3 cm durante 1 minuto todos los días.

Tabla 1. Suspensiones de microalgas utilizadas en el ensayo

SOLUCIÓN	Solución de algas (1 x 10 ⁷ células ml ⁻¹) (ml)	Agua destilada (ml)	Suspensión de algas unicelulares (células ml ⁻¹)
DOSIS 0 (D0)	0	400	0 x 10 ⁷
DOSIS 1 (D1)	100	300	0,25 x 10 ⁷
DOSIS 2 (D2)	200	200	0,5 x 10 ⁷
DOSIS 3 (D3)	300	100	0,75 x 10 ⁷
DOSIS 4 (D4)	400	0	1 x 10 ⁷

A los 25 días de iniciado el ensayo, considerado como el tiempo habitual requerido para la comercialización de plántulas para trasplante en la zona, se extrajo la plántula de cada alveolo y se realizó un lavado con agua para eliminar el sustrato adherido a las raíces. Se midió la longitud de la parte aérea y radicular con la ayuda de un calibrador digital (Anexo 7).

4.2.3. Producción de lechuga en sistema hidropónico

Infraestructura

El ensayo de producción de lechuga en cultivo hidropónico se realizó en el invernadero descrito en el Capítulo 1. Se instalaron 12 unidades de hidroponía distribuidas en 3 bloques, las tuberías de conducción de solución nutritiva eran de PVC de 3 pulgadas, con una longitud de 1,0 m unidas con codos PVC de 3 pulgadas para permitir el giro en 90° y dar continuidad a la siguiente línea de conducción.

Las tuberías de conducción en cada unidad hidropónica se ubicaron en líneas paralelas con el fin de optimizar el espacio. La conducción de agua confluye en la parte de abajo del depósito transparente de 20 litros en cuyo interior se colocó una bomba de recirculación, la cual conduce la solución nutritiva a la parte superior en donde se divide por medio de una T para la conducción a las dos tuberías de PVC (Anexo 9).

La circulación de la solución nutritiva, dentro de las conducciones, se reguló a un flujo de 2 L m^{-1} con el fin de que no afecte a las raíces de lechuga (cultivo hidropónico), ni tampoco sea muy reducido que no permite el crecimiento adecuado de las mismas.

En la parte superior de la unidad hidropónica y en donde se bifurca la salida de solución nutritiva se colocó una válvula reguladora en cada una con el fin de mantener un caudal constante en cada línea de conducción, así se logró distribuir en forma homogénea la solución nutritiva. Se realizaron 6 orificios, de 3 cm de diámetro por línea a 15 cm de distancia dando un total por cada unidad hidropónica de 60 sitios, 30 con dirección al lado este y 30 al lado oeste, para ubicar las plántulas. Con el fin de proveer de luminosidad al sistema se inclinaron las líneas de siembra unos 20° , de esta manera nos aseguramos de que todas las plantas reciban la misma luz (Figura 1).

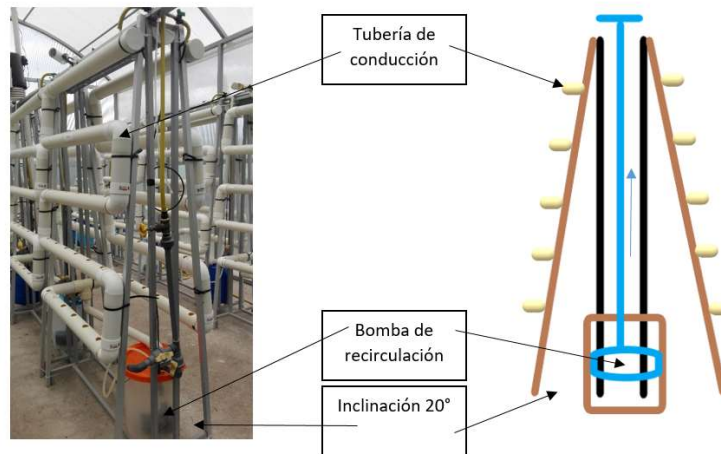


Figura 1. Unidad hidropónica en donde se observa la inclinación para facilitar iluminación solar en todas las plantas

Tratamientos aplicados

Los 4 tratamientos realizados fueron: solución hidropónica común (T1: Testigo), solución hidropónica común + concentración de algas de 40×10^4 cel ml^{-1} (T2), solución hidropónica común + concentración de algas de 80×10^4 cel ml^{-1} (T3) y solución hidropónica común + concentración de algas de 120×10^4 cel ml^{-1} (T4). Para el desarrollo del estudio se produjo *Scenedesmus* sp en el sistema de unidades fotobiorreactoras optimizado según lo descrito en los capítulos 1, 2 y 3.

El medio de hidroponía consiste en un medio acuoso al que se le añadió soluciones nutritivas, que son tradicionales para el sistema de cultivo hidropónico siguiendo las recomendaciones dadas por la FAO (FAO, 2003) tal y como se indica en la tabla 2. Se prepararon 2 soluciones hidropónicas (Solución A y B) y se almacenaron en botellas selladas en oscuridad. Con el objeto de evitar la precipitación en el sistema de hidroponía tras enrasado del tanque de recirculación a 20 litros se añadieron 125 ml de Solución A (5 mL^{-1}), se esperaba 5 minutos tras lo cual se añadieron 75 ml de

Solución B (2 mL⁻¹). Todos los tratamientos recibieron estas soluciones hidropónicas que se añadieron a los 15 y 21 días tras el inicio del experimento.

Tabla 2. Soluciones nutritivas aplicadas al cultivo hidropónico de lechuga

Solución A (Dilución en 10 litros)	
Producto	Cantidad (g)
Fosfato monoamónico	340
Nitrato de calcio	2080
Nitrato de potasio	1100
Solución B (Dilución en 4 litros)	
Producto	Cantidad (g)
Sulfato de magnesio	492,00
Sulfato de cobre	0,48
Sulfato de manganeso	2,48
Sulfato de zinc	1,20
Ácido bórico	6,20
Molibdato de amonio	0,02
Quelato de hierro	50,00

El pH de la solución del sistema recirculante y la conductividad eléctrica, se midieron diariamente y presentaron unos valores que fluctuaron entre 5,8 a 7,2 y de 1700 y 2800 μScm^{-1} respectivamente todos ellos dentro del rango óptimo del cultivo en hidroponía. Cuando el pH se alejaba de valores entre 6 y 7 se regulaba con ácido fosfórico (H_3PO_4).

Las plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) variedad cresspa utilizadas en el ensayo fueron adquiridas tras 30 días de su germinación en la empresa La Victoria S.A (PILVICSA), se

trasplantaron en el tubo de la unidad hidropónica mediante sujeción con un cilindro de espuma flex y un envase plástico provisto de un orificio que servía como soporte de la planta (Anexo 10).

Tras la colocación de la planta en la unidad hidropónica, durante los primeros 3 días solo circulaba agua en el sistema, al cuarto día se añadieron las soluciones nutritivas A y B y al noveno día se aplicaron las dosis de microalgas (Anexos 11, 12,13).

Se definieron 3 etapas: la etapa inicial en donde no se adicionaron concentraciones de microalgas (hasta el día 8), etapa media en donde se desarrollan las microalgas (hasta el día 20), y la etapa final cuando disminuye la producción de microalgas (hasta el día 30).

Parámetros analizados

Se evaluó el consumo de agua en cada unidad hidropónica diariamente mediante la adición de agua al finalizar el día con la ayuda de una probeta, la cantidad añadida se considera el volumen consumido en un día por cada unidad hidropónica.

Para determinar la concentración microalgal en el tanque de recirculación se realizó el conteo celular con un microscopio con una cámara de Neubauer.

La lechuga se cosechó en 30 días, se transportó al laboratorio en donde se determinó la longitud de raíz al cuello de la planta, longitud de la parte aérea planta, biomasa total en fresco de hoja y raíz de la lechuga.

4.2.4 Análisis estadístico

En todos los ensayos para determinar el efecto de los tratamientos se aplicó un test ANOVA y posteriormente la prueba *post hoc* de Tukey ($p \leq 0,05$). Todos los modelos se validaron con la prueba de *Shapiro Wilk* para determinar normalidad y para homogeneidad de varianzas se utilizó el test de *Bartlett*. Se utilizó el programa R para el análisis estadístico.

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Efecto de las concentraciones de *Scenedesmus* sp y temperaturas sobre la germinación

Todas las semillas de lechuga germinaron al segundo día de empezar el experimento para todas las dosis de *Scenedesmus* sp aplicadas, así pues, las distintas concentraciones de microalgas no influyeron significativamente en el porcentaje de germinación de las semillas de lechuga (Anexos 2, 3, 4, 5, 6). En relación al efecto de la temperatura de incubación el porcentaje de germinación fue significativamente menor a 15°C que los tratamientos incubados a 20°C y 25°C (Anexo 1)

Karthik y col (2020) aplicaron soluciones de algas marinas como bioestimulante en semillas de rábano (*Raphanus sativus*), guisante verde (*Phaseolus vulgaris*) y frijól (*Vigna radiata*) con concentraciones de 80 y 100% dando lugar a un 100% de germinación, lo cual podría estar relacionado con la presencia de compuestos bioactivos y con actividad antifúngica que promueven el crecimiento de las plantas. Por otra parte, el empleo de extracto de algas (Consorcio de *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Spirulina* sp., y *Synechocystis* sp.) entre el 20% y 60% de concentración acelera la germinación de *Solanum lycopersicum* en 3 días comparado con las semillas sin tratar (Supraja y col., 2020), también se observó que el empleo de macroalgas como *Padina gymnospora* o soluciones combinadas de algas marinas (*Ulva lactuca*, *Caulerpa sertularioides*, *Padina gymnopora* y *Sargassum liebmannii*) mejoran la germinación y concentración de fitoquímicos en *Capsicum annum* (Shamia y col., 2020) y en semillas de tomate (Hernández-Herrera y col., 2014), respetivamente, al igual que sucede con la microalga *Acutodesmus dimorphus* sobre la semilla de tomate (García-González y Sommerfeld, 2016). A pesar de que en la literatura se observa un efecto positivo de la aplicación de microalgas sobre la germinación, nuestros resultados no muestran un efecto positivo tras

la adición de diferentes dosis de *Scenedesmus* sp. Este hecho podría estar relacionado con la elevada capacidad de la semilla de lechuga para germinar en cortos períodos de tiempo, ya que presenta las reservas necesarias para nutrir a la plántula en los primeros estadios de desarrollo y una menor dependencia de la rotura de la cubierta de la semilla en el exterior.

Los resultados obtenidos para los tratamientos con distintas concentraciones de *Scenedesmus* sp a distintas temperaturas en relación a la longitud de la plántula, tras 6 días de incubación, se muestran en Figura 2. El análisis de varianza detecta diferencias altamente significativas para la interacción temperatura y concentración de microalgas ($p < 0,01$) de la misma manera que para el factor temperatura. El mayor crecimiento se obtuvo con una temperatura de 25°C y con una concentración de microalgas de 6×10^7 células ml^{-1} . En general, se observa que el factor temperatura tiene un marcado efecto sobre el desarrollo longitudinal de la plántula, con un mayor y significativo desarrollo a temperaturas más altas, y resultando las más bajas muy limitantes. Cuando la temperatura es de 25°C no hay diferencias entre tratamientos de concentración de microalgas, pero cuando la temperatura es intermedia se observa un efecto significativo del empleo de microalgas a dosis más altas sobre el testigo y la dosis más baja de microalgas en la misma temperatura, lo que implica que el empleo de microalgas contribuye al desarrollo de las plántulas de lechuga a temperaturas sub-óptimas, aspecto que puede ser considerado a la hora de realizar un estudio de costes/beneficios (Anexo 8).

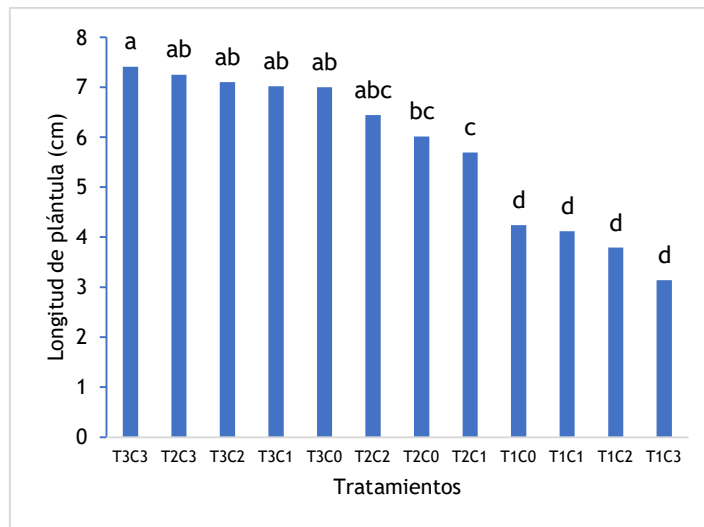


Figura 2. Longitud de la parte aérea de plántulas de lechuga para cada tratamiento en donde interactúan temperatura con concentraciones de microalgas. T1=15°C, T2=20°C, T3=25°C; C0: sin algas; C1: 2×10^7 células ml^{-1} ; C2: 4×10^7 células ml^{-1} ; C3: 6×10^7 células ml^{-1} . Letras distintas entre los tratamientos indican diferencias significativas en la altura de la plántula (Tukey, $p < 0,05$)

En relación a la longitud de la radícula, el análisis de varianza muestra diferencias altamente significativas ($p < 0,01$), para la temperatura y la concentración de microalgas. La longitud de la radícula fue significativamente superior en las semillas de lechuga incubadas a 20 y 25°C que las que permanecieron a 15°C, mientras que todos los tratamientos con distintas concentraciones de *Scenedesmus* sp presentan longitudes de la raíz estadísticamente mayores que el control sin aplicación (Figura 3 A y B). El desarrollo de la radícula está directamente asociado con la capacidad de supervivencia de la planta, ya que es la principal vía de entrada de nutrientes a la misma.

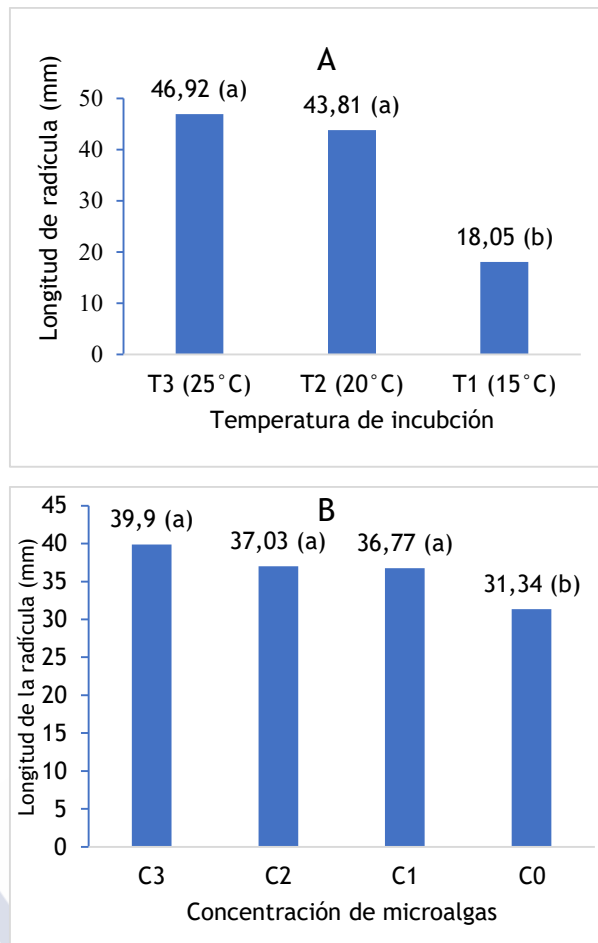


Figura 3. Efecto de la temperatura de incubación (15, 20 y 25°C) (A) y de la concentración de microalgas *Scenedesmus* sp (B) (C0= 0, C1= 2, C2= 4 y C3= 6×10^7 células ml^{-1}) en la longitud de la radícula. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$)

Los resultados indican que la mejor temperatura para el crecimiento tanto de radícula como de plántula es de 20°C y 25°C.

Además, la aplicación de concentraciones de microalgas en la etapa de germinación de las semillas de lechuga influye positivamente en el crecimiento de la plántula, sobre todo a temperatura de 20°C (figuras 3A y 3B). Se han obtenido resultados similares a los nuestros al aplicar diferentes extractos de algas marinas (*Laurencia obtusa*) a semillas de trigo, observándose un incremento de la longitud de la radícula y la parte aérea de las plántulas (Ibrahim, 2016). De igual modo en semillas de tomate (*Lycopersicum sculentum*) tratadas con distintas concentraciones (20, 40, 60, 80 y 100%) de un consorcio de algas (*Chlorella* sp, *Scenedesmus* sp., *Spirulina* sp y *Synechocystis* sp) observaron el incremento de longitud de brote y de raíz (Supraja y col., 2020).

4.3.2 Producción de plántulas de lechuga en alveolo

Los resultados de la tabla 3 muestran que la longitud de la parte aérea fue significativamente superior en las plántulas fertilizadas (134,50 mm) frente a las no fertilizadas (116,80 mm); mientras que la aplicación de distintas concentraciones de microalgas no mostró diferencias significativas en el desarrollo de la parte aérea y radicular de las plántulas tanto en las plantas sometidas a fertilización como a las que no (Tabla 3). Estos resultados pueden explicarse porque el factor limitante es la fertilización y porque el tiempo necesario para mostrar el efecto de los tratamientos con microalgas es reducido, los efectos bioestimulantes podrían verse reflejados en etapas posteriores del cultivo de lechuga.

Tabla 3. Longitud de la parte aérea y radicular de plantas de lechuga crecidas en bandeja con y sin la aplicación de fertilización y suspensión de microalgas.

Aplicación de fertilización	Longitud parte aérea (mm) p=0,00695	Longitud parte radicular (mm) p=0,0013
Con fertilización	134,50 ^a	64,57 ^b
Sin fertilización	116,80 ^b	75,36 ^a

Suspensión de microalgas con fertilización	Longitud parte aérea (mm) p=0,538	Longitud parte radicular (mm) p=0,892
D0	132,95 ^a	65,87 ^a
D1	136,55 ^a	62,80 ^a
D2	134,33 ^a	64,93 ^a
D3	130,64 ^a	62,74 ^a
D4	138,03 ^a	66,49 ^a
Suspensión de microalgas sin fertilización	Longitud parte aérea (mm) p=0,723	Longitud parte radicular (mm) p=0,407
D0	113,45 ^a	81,23 ^a
D1	118,45 ^a	79,23 ^a
D2	114,75 ^a	78,59 ^a
D3	119,81 ^a	73,88 ^a
D4	120,82 ^a	63,87 ^a

D0: sin algas; D1: $0,25 \times 10^7$ células ml⁻¹; D2: $0,50 \times 10^7$ células ml⁻¹; D3: $0,75 \times 10^7$ células ml⁻¹, D4: $0,75 \times 10^7$ células ml⁻¹. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05)

4.3.3 Producción de lechuga en cultivo hidropónico

Consumo de agua

El consumo de agua en el sistema hidropónico, en todos los tratamientos, se incrementó gradualmente, esto debido al crecimiento de las plantas y de las microalgas. No obstante, el consumo es muy inferior al necesario en el cultivo tradicional. Este aumento se aprecia desde el día 4 hasta la finalización del cultivo desde 0 a 4 litros por día y por unidad hidropónica (Figura 4). Moreno y col (2015) mencionan que “el consumo uniforme de agua puede deberse a que las condiciones ambientales de la solución nutritiva (temperatura, pH y CE) fueron también más estables en este sistema”.

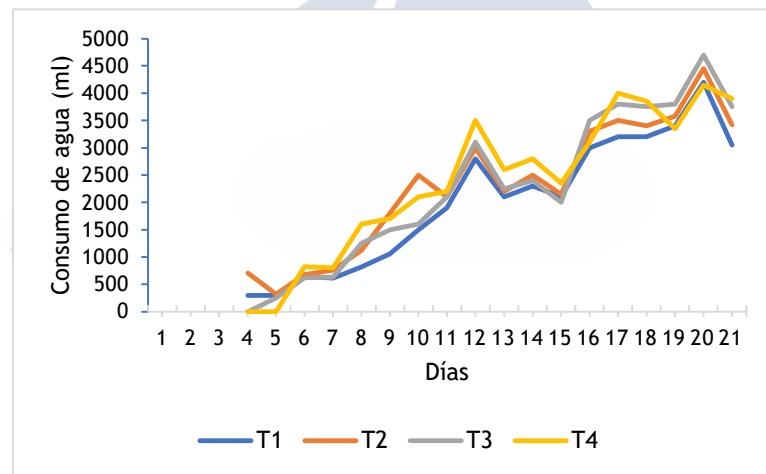


Figura 4. Evaluación de consumo de agua (T1: solución hidropónica común; T2: solución hidropónica común + suspensión de microalgas 40×10^4 cel ml^{-1} ; T3: solución hidropónica común + suspensión de microalgas media: 80×10^4 cel ml^{-1} . T4: solución hidropónica común + suspensión de microalgas alta: 120×10^4 cel ml^{-1}).

Los tratamientos aplicados no parecen afectar al consumo de agua frente al control.

Concentración microalgal en el tanque de recirculación

En la figura 5 se muestra la evolución temporal del crecimiento de microalgas en los tratamientos de *Scenedesmus* sp. aplicados. En T1 no se encuentran microalgas mientras que en el tratamiento T4 las células llegan a 266×10^4 cél ml^{-1} . A partir de la adición de las microalgas su fase de crecimiento fue de 20 días. En el día 23 las microalgas tienen un decrecimiento en su conteo celular, esto se puede deber a que no hay suficientes nutrientes en el medio, ya que se agotan las reservas. La presencia de las microalgas en el cultivo hidropónico constituye en una evidencia de que éstas se desarrollan en la solución hidropónica favoreciendo el desarrollo de hojas y raíces de plantas de lechuga, esto coincide con los resultados de Moreno y col (2015).

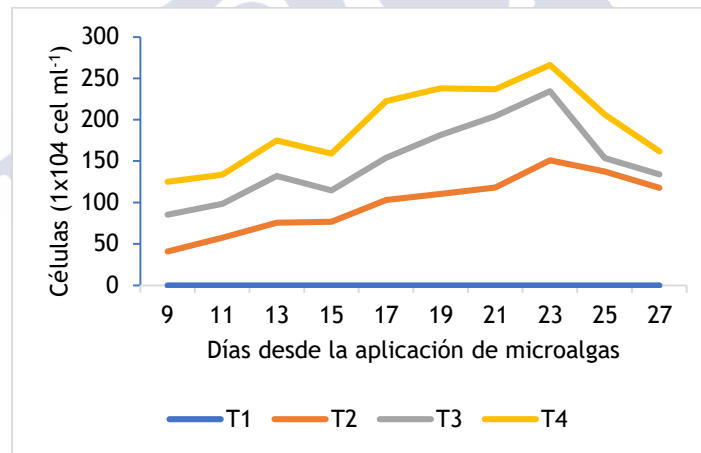


Figura 5. Crecimiento de microalgas por tratamiento (T1: solución hidropónica común; T2: solución hidropónica común + suspensión de microalgas 40×10^4 cel ml^{-1} ; T3: solución hidropónica común + suspensión de microalgas media: 80×10^4 cel ml^{-1} . T4: solución hidropónica común + suspensión de microalgas alta: 120×10^4 cel ml^{-1}).

Crecimiento de lechuga

En la Figura 6 se muestra el efecto de la aplicación de distintas dosis de *Scenedesmus* sp sobre el peso y la longitud de la raíz en plántulas de lechuga. El peso de la raíz en el tratamiento T3 presenta un valor significativamente superior al control (5,23 g), sin embargo, en relación a la longitud radicular no existen diferencias significativas entre los tratamientos, pero se observa una tendencia de mayor longitud en el tratamiento T3

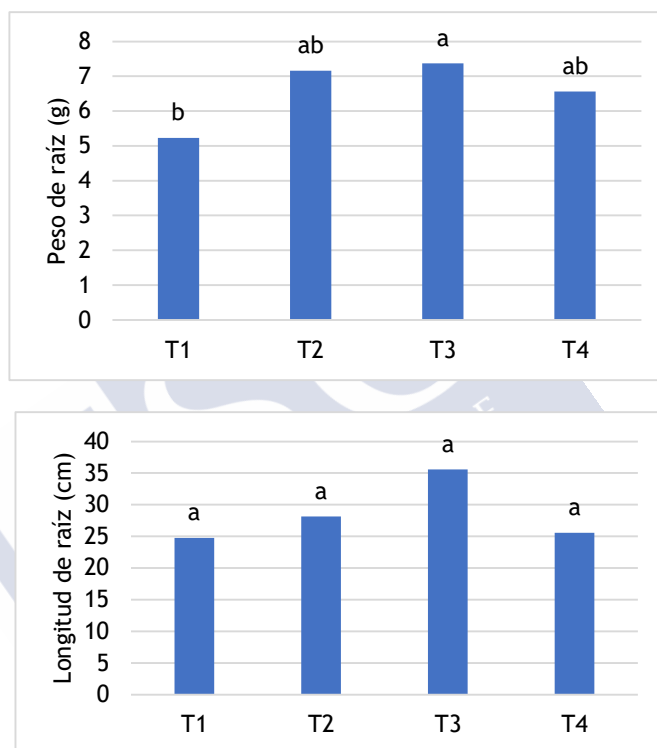


Figura 6. Peso fresco y longitud de raíz (T1: solución hidropónica común; T2: solución hidropónica común + suspensión de microalgas 40×10^4 cel ml^{-1} ; T3: solución hidropónica común + suspensión de microalgas media: 80×10^4 cel ml^{-1} . T4: solución hidropónica común + suspensión de microalgas alta: 120×10^4 cel ml^{-1}). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$)

En relación al peso de las hojas de lechuga los tratamientos T2, T3 y T4 presentan valores superiores al T1 (sin adición de algas), siendo el tratamiento T3 (solución hidropónica común + concentración de microalgas media: 80×10^4 cel ml^{-1}) significativamente superior al T1 (Figura 7). Estos resultados indican que la adición de microalgas tiene capacidad bioestimulante favoreciendo el crecimiento de la lechuga.

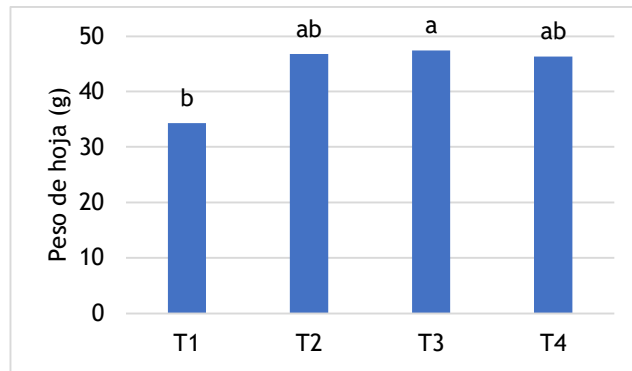


Figura 7. Peso de hoja (T1: solución hidropónica común; T2: solución hidropónica común + suspensión de microalgas 40×10^4 cel ml^{-1} ; T3: solución hidropónica común + suspensión de microalgas media: 80×10^4 cel ml^{-1} . T4: solución hidropónica común + suspensión de microalgas alta: 120×10^4 cel ml^{-1}). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$)

En general, el uso de sustancias tales como aminoácidos, extractos vegetales y/o bioestimulantes presenta efectos positivos sobre el crecimiento y rendimiento de las plantas (Brown y Saa, 2015). Las algas son ricas en compuestos tales como lípidos, proteínas y carbohidratos, así como de fitohormonas que estimulan el crecimiento de especies vegetales (Nabti y col., 2017; Nedumaran 2017). En este sentido nuestros resultados muestran que la adición de algas en la solución nutritiva del medio de cultivo hidropónico favorece el desarrollo de la lechuga (*Lactuca sativa*) (Anexo 13). Otros trabajos realizados en cultivo hidropónico en tomate con adición de *S. quadricauda* y *C. vulgaris* (Barone y col., 2018),

indican incrementos en la biomasa de los cultivos corroborando los resultados por nosotros obtenidos. En las aplicaciones de bioestimulantes vegetales con microalgas han mejorado el crecimiento, el rendimiento y la calidad del fruto en tomates (Zodape, 2011). Díaz y col (2016) indican que las microalgas vivas incrementan el rendimiento del cultivo de lechuga en un sistema hidropónico, puesto que permite que las plantas absorban los nutrientes que estas proveen en su etapa de crecimiento.

4.4 Conclusiones

La aplicación de concentraciones de microalgas de *Scenedesmus* sp en las semillas de lechuga, en placa Petri, no estimularon la germinación, lo que sí es evidente es que las temperaturas de 20 y 25°C frente a 15°C sí contribuye a disminuir los días hasta la germinación. El crecimiento radicular se vio favorecido con la aplicación de concentraciones de microalgas de *Scenedesmus* sp sobre todo a temperaturas intermedias.

La aplicación de distintas dosis de concentraciones de *Scenedesmus* sp en bandejas de germinación no incrementó la longitud de la raíz y de la parte aérea, tanto en los tratamientos fertilizados como en aquellos que no tenían.

La solución hidropónica base en la que se aplicó concentraciones de $80 \times 10^4 \text{ cel ml}^{-1}$ de *Scenedesmus* sp en plantas de lechuga incrementó el peso de raíz y de la parte aérea frente al control lo que se traduce en una mayor producción.

El uso de concentraciones de microalgas vivas en las distintas fases de producción de lechuga evidencia que podrían ser utilizadas como fitoestimulantes principalmente en los cultivos hidropónicos ya que incrementan su desarrollo.

4.5 Referencias bibliográficas

- Aremu, A., Plačková, L., & Gruz, J. (2016). Bioestimulante derivado de algas (Kelpak ®) influye en las citoquininas endógenas y los compuestos bioactivos en *Eucomis autumnalis* cultivado hidropónicamente. *J Plant Growth Regul*, 35, 151-162. doi: <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9515-8>
- Barone, V., Baglieri, V., Stevanato, P., Broccanello, C., Bertoldo, C., Bertaggia, M., Concheri, G. (2018). Root morphological and molecular responses induced by microalgae extracts in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Applied Phycology*, 30, 1061-1071. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1283-3>
- Beltrano, J., & Giménez, O. (2015). Beltrano, J. (2015). Cultivo en hidroponía. Obtenido de Universidad Nacional de La Plata: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46752/Documento_completo.pdf?sequence=1. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46752/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Brown, P., & Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Plant Sci*. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00671>
- Craigie, J. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. 23, 371-393. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9560-4>
- Díaz-Leguizamón, J., Chingaté-Cruz, O., Sánchez-Reinoso, A., & Restrepo-Díaz, H. (2016). The effect of foliar applications of a bio-stimulant derived from algae extract on the physiological behavior of lulo seedlings (*Solanum quitoense* cv. Septentrionale). *Cienc. Inv. Agr.*, 43(1).
- FAO. (2003). *La huerta hidropónica popular*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-ah501s.pdf>

- García-González, J., & Sommerfeld, M. (2016). Propiedades biofertilizantes y bioestimulantes de la microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J Appl Phycol*, 1051–1061. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0625-2>
- Hernández-Herrera, R., Santacruz-Ruvalcaba, F., & Ruiz-López, M. (2014). Efecto de extractos líquidos de algas sobre el crecimiento de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *J Appl Phycol*, 26, 619–628. doi: <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0078-4>
- Ibrahim, W. (2016). Potential Impact of Marine Algal Extracts on the Growth and Metabolic Activities of Salinity Stressed Wheat Seedlings. *Journal of Applied Sciences*, 16(388-394). doi: 10.3923/jas.2016.388.394
- Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Karthik, T., Sarkar, G., Babu, S., Amalraj, L., & Jayasri, M. (2020). Preparation and evaluation of liquid fertilizer from *Turbinaria ornata* and *Ulva reticulata*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101712>
- Moreno-Pérez, E., Sánchez-Del Castillo, F., Gutiérrez-Tlaque, J., González-Molina, L., & Pineda-Pineda, J. (2015). Greenhouse lettuce production with and. *REVISTA CHAPINGO SERIE HORTICULTURA*, 21(1), 43-55. doi: 10.5154/r.rchsh.2013.12.047
- Nabti, E., Jha, B., & Hartmann, A. (s.f.). Impact of seaweeds on agricultural crop production as biofertilizer. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14, 1119-1134. doi: <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1202-1>

- Nedumaran, A. (2017). *Sustainable Agriculture towards Food Security*.
- Shamia, M., Thriunavukkarasu, R., Joseph, J., & Aruni, W. (2020). Effect of seaweed on seed germination and biochemical constituents of *Capsicum annum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101761>
- Supraja, K., Behera, B., & Balasubramanian, P. (2020). Efficacy of microalgal extracts as biostimulants through seed treatment and foliar spray for tomato cultivation. *Industrial Crops and Products*, 151. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112453>
- Zhang, J., Wang, X., & Zhou, Q. (2017). Co-cultivation of *Chlorella* spp and tomato in a hydroponic system. *Biomass and Bioenergy*, 97, 132-138. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.12.024>
- Zodape, S. (2011). Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Sci. Ind. Res.*, 70, 215-219.

CONCLUSIONES

El sistema de fotobiorreactores implementado en base a la patente ES2347515A1 constituye en una opción muy válida para la implementación en pequeñas industrias que generan gases de combustión.

El desarrollo de una estructura tipo invernadero que acoge a las 16 unidades fotobiorreactoras permitió establecer una infraestructura piloto para industrias en las que se generan gases de combustión.

Desde un punto de vista físico, el prototipo diseñado probó con éxito (i) una manga plástica que permite almacenar gases de combustión de motores diésel-gasolina para su posterior uso en mezcla con aire que permite realizar una distribución homogénea por toda la unidad fotobiorreactora (ii) un soporte a base de poliestireno expandido para la construcción de las unidades fotobiorreactoras que les confiere una estructura de material liviano y que no absorbe la humedad (iii) un material textil de tipo polar (100% poliéster) al que las microalgas se adhieren de forma adecuada y que favorece la recolección cada 7 días mediante raspado con un período de recambio reducido ya que no se descompone a diferencia de lo que ocurre con las fibras naturales.

Desde una perspectiva funcional se consiguió que la solución nutritiva, cuya concentración óptima de N y CO₂ es de 100 mg L⁻¹ y de 1500 ppm respectivamente, circule por toda la lámina sin que se generen espacios vacíos en el material textil, permitiendo un caudal adecuado de solución nutritiva en la que la concentración de microalgas es baja.

El crecimiento aéreo y radical de lechuga cultivada en un sistema hidropónico cuya solución nutritiva incluye *Scenedesmus* se vio incrementado.

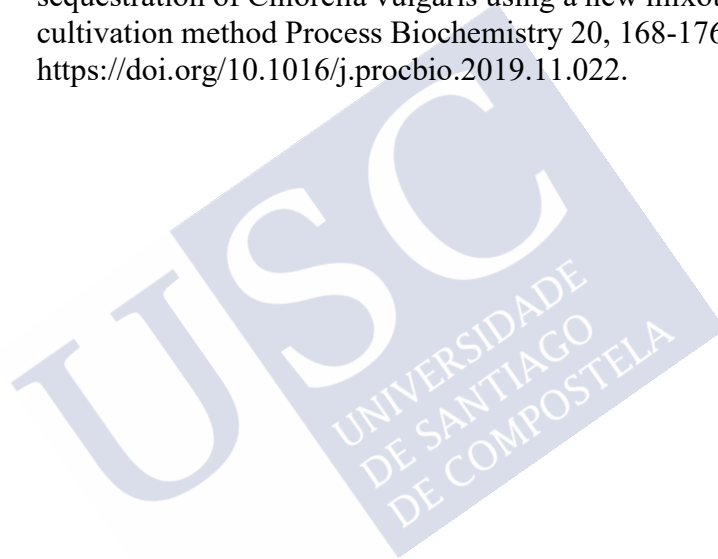
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Ghussain, L. (2019). Global warming: review on driving forces and mitigation. *nviron Prog Sustainable Energy*, 38, 13-21. doi:<https://doi.org/10.1002/ep.13041>
- Chatterjee, A., Singh, S., Agrawal, C., Yadav, S., Rai, R., & Rai, L. (2017). Chapter 10 - Role of Algae as a Biofertilizer. *Algal Green Chemistry*, 189-200. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00010-2>.
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., . . . Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229, 53-62. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>.
- CredenceResearh* . (11 de Febrero de 2020). Obtenido de <https://www.credenceresearch.com/press/global-algae-products-market>
- FAO (2009) Algae-based biofuels: A Review of challenges and opportunities for developing countries Rome 60 p. Extraído de: http://www.fao.org/fileadmin/templates/aquaticbiofuels/docs/0905_FAO_Review_Paper_on_Algae-based_Biofuels.pdf
- García, J. L., de Vicente, M., & Galan, B. (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals Microbial biotechnology. *Microbial biotechnology*, 10, 1017-1024. doi:10.1111/1751-7915.12800
- Giorgos, M., Dries, V. y Koenraad, M, 2014 Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients Wather Reseach 65 pp. 186-202.
- Khoo, C. G., Dasan, Y. K., Lam, M. K., & Lee, K. T. (2019). Algae biorefinery: Review on a broad spectrum of downstream processes and products. *Bioresource Technology*,

292(121964).
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121964>.

- Leu, S., & Boussiba, S. (2014). Advances in production of High-Value Products by Microalgae. *Industrial Biotechnology*, 10(3), 169-183. doi:<https://doi.org/10.1089/ind.2013.0039>
- Lu, W., Alam, A., Liu, S., Xu, J., & Parra, R. (2020). Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO₂. *Science of The Total Environment*, 716(135247). doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135247>.
- Naciones Unidas. (2021). *Objetivos de desarrollo sostenible*.
Obtenido de
<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/climate-change-2/>
- Mantzorou, A., & Ververidis, F. (2019). Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. *Science of The Total Environment*, 651(Part 2), 3187-3201. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.355>
- Moreira, D., & Pires, J. C. M. (2016). Atmospheric CO₂ capture by algae: Negative carbon dioxide emission path. *Bioresource Technology*, 215, 371-379. doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.060
- Pires, J., Alvim-Ferraz, M, Martins, F., Simoes, M. (2012) Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae. Engineering aspects and biorefinery concept Renewable and Sustainable Energy Reviews 16 pp 3043- 3053
- Pires, J. (2017). COP21: The algae opportunity? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 867-877. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.197>
- Shabani, M., Sayadi, M. H., & Rezaei, M. R. (2016). Evaluation of carbon sequestration ability by chlorella vulgarism water with different salinity. *Journal of Environmental Studies*, 41(4), 879-886. doi: 10.22059/JES.2016.57141

- Sudhakar, M. P., Kumar, B. R., Mathimani, T., & Arunkumar, K. (2019). A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective. *Journal of Cleaner Production*, 1320-1333. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.287>.
- Yadav, A., Choudhary, P., Atri, N., Teir, S., & Mutnuri, S. (2016). Pilot project at hazira, india, for capture of carbon dioxide and its biofixation using microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(22), 22284-22291. doi:10.1007/s11356-016-6479-6
- Yu, Q., Li, W, Yin, Y, Ge, B (2020). Enhanced biomass and CO₂ sequestration of *Chlorella vulgaris* using a new mixotrophic cultivation method *Process Biochemistry* 20, 168-176. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.022>.



Anexos Capítulo 1

Anexo 1. Secuencia fotográfica de la generación y distribución de gases de combustión

 <p>Generador eléctrico usado para producir los gases de combustión (Diesel)</p>	 <p>Enfriamiento de gases de combustión previo al almacenamiento</p>
 <p>Manga plástica de 15 m de largo para almacenamiento de gases</p>	 <p>Compresor en donde se almacenan los gases de combustión para su posterior distribución</p>
 <p>Cámara de mezcla de gases de combustión y aire</p>	 <p>Sistema de conducción de gases a cada unidad fotobiorreactora</p>

Anexo 2. Instalación de sistema de unidades fotobiorreactoras

	
Primera cavidad formada en el panel	Dos cavidades formadas en el panel
	
Tres cavidades formadas en el panel	Cuatro cavidades formadas
	
Colocación de malla sarán con sujeción de perfiles de aluminio	Sistema de distribución de agua a los paneles
	
Soporte metálico para sujeción	Válvula reguladora del sistema de flujo
	
Doble sistema de distribución de agua al panel	Distribución homogénea de la solución nutritiva en el panel

 <p>Vista de un bloque constituido por cuatro tratamientos</p>	 <p>Uso de lámina plástica para una distribución correcta del agua</p>
 <p>Tanque de almacenamiento de agua de recirculación</p>	 <p>Uso de placa en base de panel para que deje circular libremente el agua</p>
 <p>Tanque de almacenamiento de algas unicelulares, se observa línea de recirculación de agua de los paneles al tanque</p>	 <p>Vista interna del tanque de almacenamiento en donde se observa tubo de descarga luego de pasar por la lámina textil</p>
 <p>Bomba de recirculación ubicada en el tanque de almacenamiento</p>	 <p>Esponja de referencia para colocación de agua</p>

 <p>Llaves de paso para regulación del caudal</p>	 <p>Control eléctrico para el funcionamiento de las bombas de agua</p>
 <p>Vista frontal de invernadero con paneles verticales instalados</p>	 <p>Ventiladores automáticos en el invernadero</p>
 <p>Ventana cenital para salida de aire caliente</p>	 <p>Estación climática para medición de condiciones ambientales</p>
 <p>Desmineralizador de agua</p>	 <p>Separación entre unidades experimentales</p>

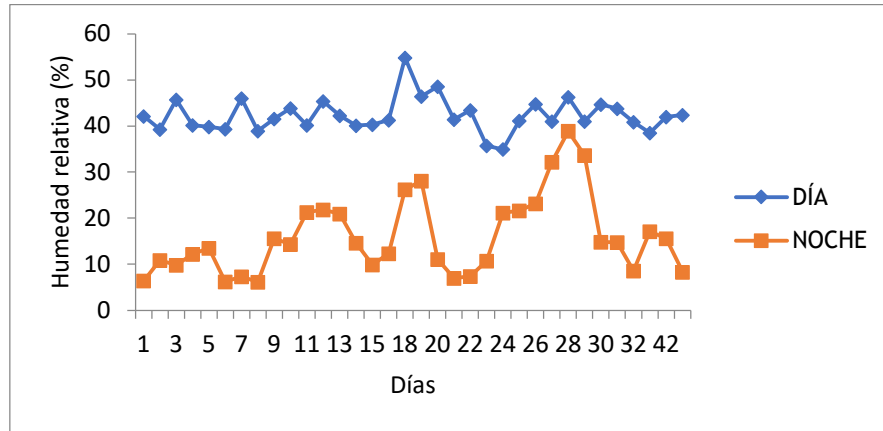
Anexos Capítulo 2.

Anexo 1. Secuencia fotográfica de la instalación del ensayo de material de soporte

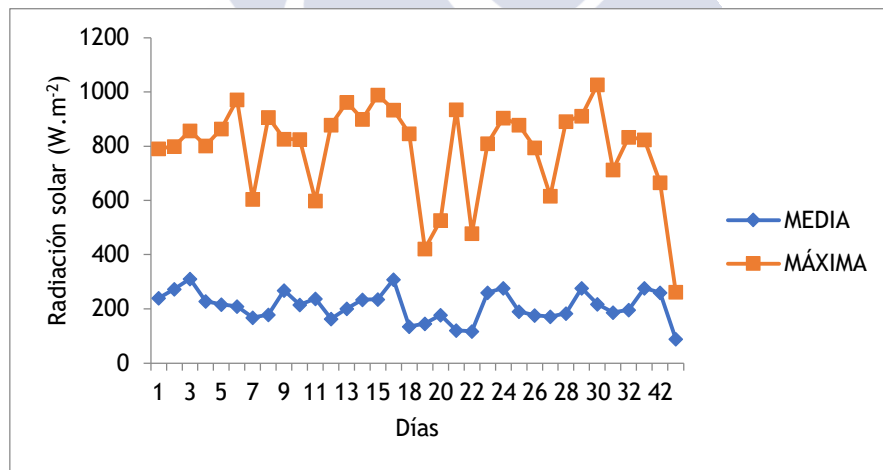
 <p>Preparación de solución de algas con nutriente</p>	 <p>Preparación de láminas en el ensayo</p>
 <p>Adición de solución de microalgas al tanque</p>	 <p>Humedecimiento de paneles verticales</p>
 <p>Vista general del ensayo</p>	 <p>Solución de algas recirculando en el sistema al primer día.</p>

Anexo 2. Condiciones climáticas en el ensayo de láminas textiles

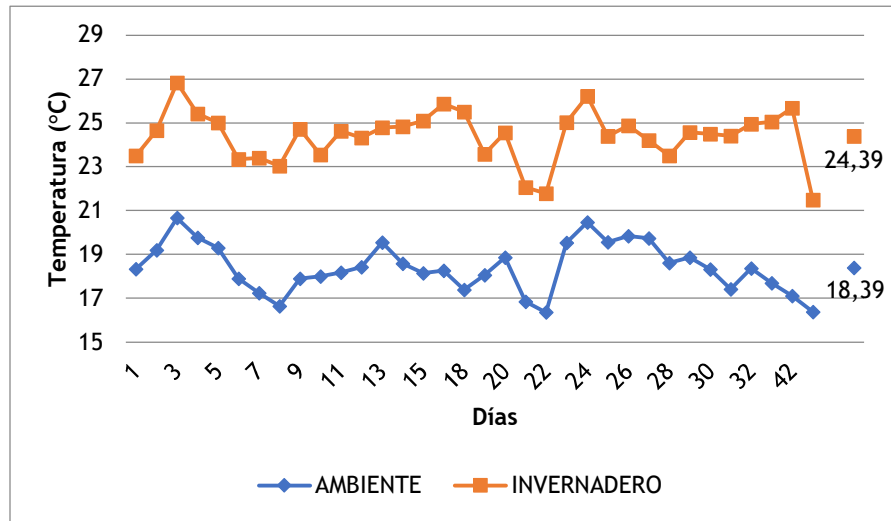
Comportamiento de la humedad relativa durante la fase de evaluación de material de soporte



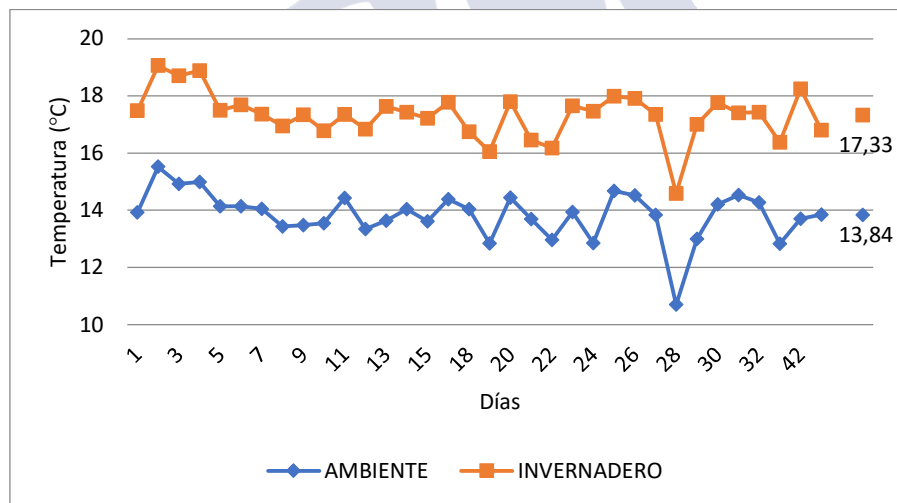
Comportamiento de la radiación solar en la fase de evaluación de material de soporte



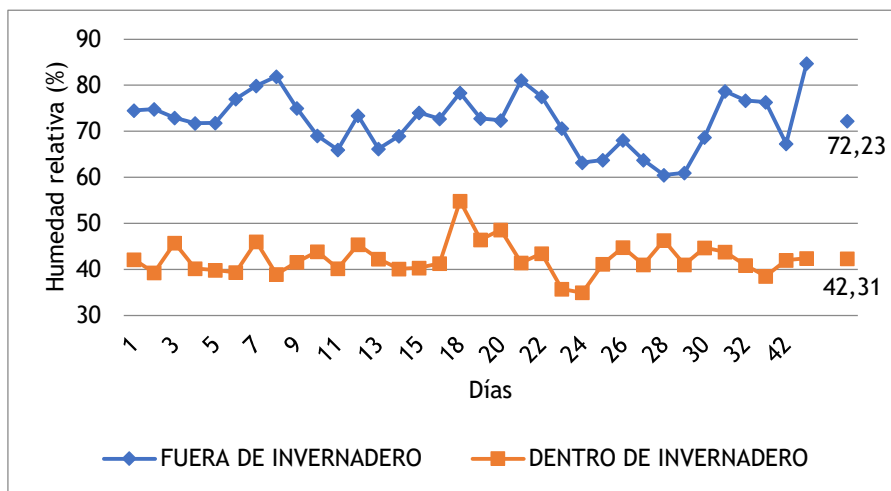
Comparación de la temperatura del día fuera y dentro del invernadero



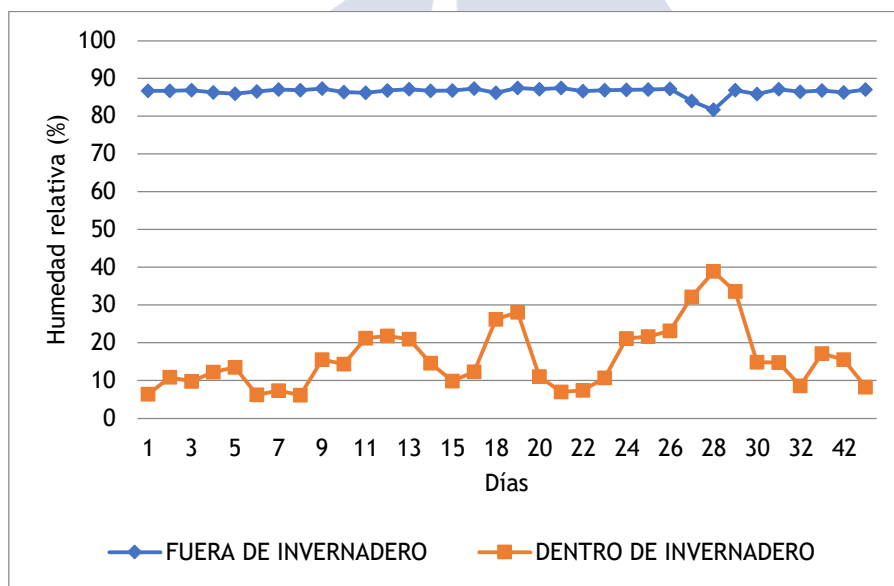
Comparación de la temperatura de la noche fuera y dentro del invernadero



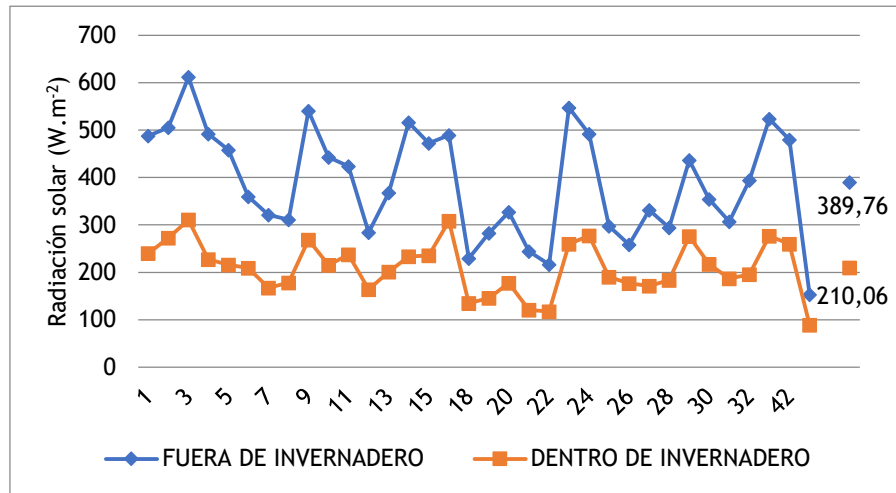
Comparación de la humedad relativa del día fuera y dentro de invernadero



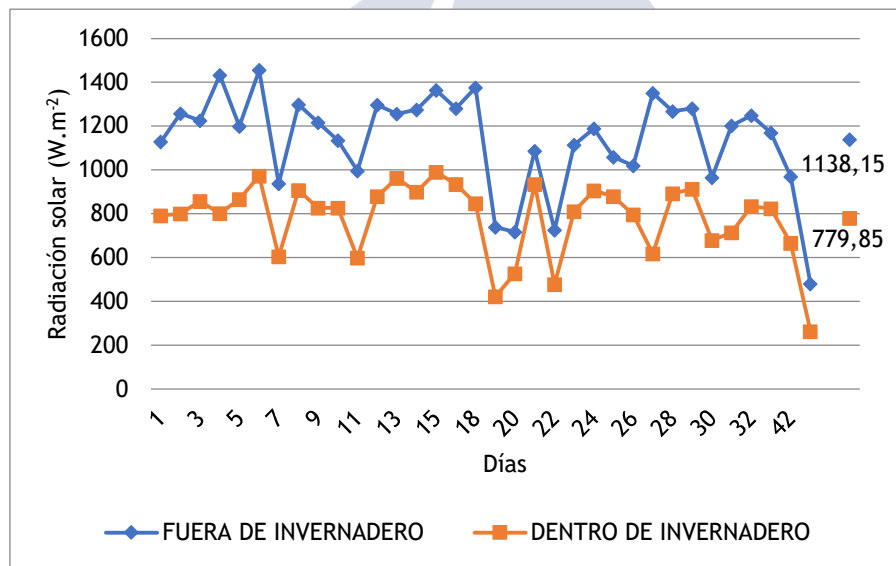
Comparación de la humedad relativa de la noche fuera y dentro de invernadero



Comparación de la radiación solar media fuera y dentro de invernadero






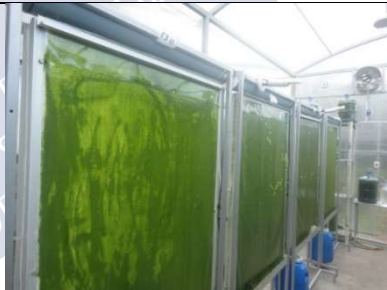


Comparación de la radiación solar máxima fuera y dentro de invernadero



Anexo 3. Etapas de desarrollo de algas unicelulares

 <p>Tanque de 200 litros en donde se preparó el inóculo inicial</p>	 <p>Distribución del inóculo en las unidades experimentales</p>
 <p>Colocación de inóculo en el tanque de almacenamiento</p>	 <p>Todas las unidades fotobiorreactoras cuentan con la mezcla de algas unicelulares.</p>
 <p>Se humedece cada lámina textil previo al encendido del sistema</p>	 <p>Una vez activada la bomba de recirculación se inicia con la siembra de algas unicelulares en la lámina.</p>

 <p data-bbox="435 512 794 569">Se aprecia que lámina cambia de color inmediatamente</p>	 <p data-bbox="867 512 1263 596">Vista general de las unidades experimentales luego de 24 horas de realizado la siembra</p>
 <p data-bbox="451 884 779 940">Vista general a las 48 horas de realizada la siembra</p>	 <p data-bbox="850 884 1284 940">Vista general a los 5 días de realizada la siembra</p>
 <p data-bbox="456 1281 776 1337">Vista general a los 10 días de realizada la siembra</p>	 <p data-bbox="857 1281 1279 1337">Vista general a los 15 días de realizada la siembra</p>

 <p>Vista general a los 20 días de realizada la siembra</p>	 <p>Vista general a los 25 días de realizada la siembra</p>
 <p>Método utilizado para la cosecha de algas unicelulares</p>  <p>Vista de lámina luego de la cosecha</p>	 <p>Cosecha de algas raspando la lámina de abajo hacia arriba con una botella de boca ancha.</p>
 <p>Encendido de la bomba de recirculación luego de la cosecha</p>	 <p>Luego de encendido se aprecia en la lámina que las algas restantes comienzan a poblar nuevamente la lámina textil</p>



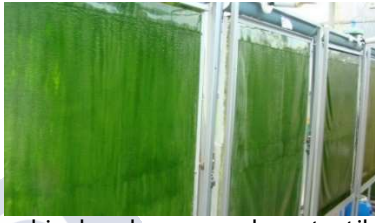
Cosecha de algas unicelulares por unidad experimental



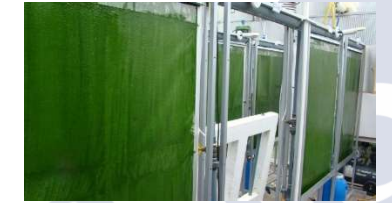
Toma de muestras para análisis de laboratorio



Vista de láminas textiles luego de realizada la cosecha



Cambio de color en panel con textil T4



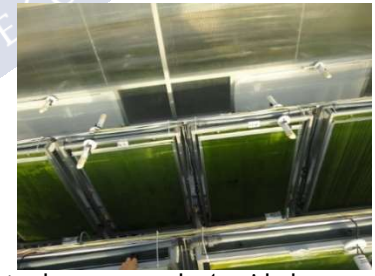
Suspensión de tratamiento 4 en el sistema



Vista general de invernadero



Distribución de los paneles de algas unicelulares



Vista de un grupo de 4 unidades fotobiorreactoras

Anexo 4. Medición de variables

 <p>Centrífuga para extracción de materia seca</p>	 <p>Balanza analítica</p>
 <p>Medición de radiación fotosintéticamente activa</p>	 <p>Medición de luminosidad</p>
 <p>Equipo para medición de gases de combustión</p>	 <p>Medición de Potasio y nitratos en las muestras cosechadas</p>
 <p>Equipo de medición de pH y conductividad eléctrica</p>	 <p>Equipo de medición de absorbancia</p>
 <p>Microscopio usado para conteo celular</p>	 <p>Equipo para medición de variables climáticas</p>

Anexo 5. Medición de variables para ensayo de materiales textiles (Medición de pH)

	T1				Media	T2				Media	T3				Media
	I	II	III	IV		I	II	III	IV		I	II	III	IV	
05-nov-14	6,652	6,542	6,447	6,670	6,578	6,571	6,487	6,328	6,679	6,516	6,518	6,444	6,515	6,483	6,490
06-nov-14	7,811	7,890	7,794	7,952	7,862	7,946	7,719	7,963	8,067	7,924	7,816	7,657	7,741	7,873	7,772
08-nov-14	7,736	7,778	7,917	7,965	7,849	7,693	7,542	8,322	8,374	7,983	7,553	7,700	7,698	7,857	7,702
10-nov-14	8,932	9,364	9,370	9,563	9,307	9,329	8,163	9,394	9,664	9,138	9,415	8,658	9,246	9,630	9,237
12-nov-14	9,101	9,381	9,587	9,809	9,470	9,343	8,982	9,676	9,774	9,444	9,353	9,132	9,587	9,841	9,478
14-nov-14	9,533	9,626	9,767	10,051	9,744	9,764	9,452	9,797	9,994	9,752	9,680	9,506	9,729	10,077	9,748
17-nov-14	9,597	9,802	10,208	10,364	9,993	9,560	9,860	10,133	10,126	9,920	9,836	9,761	10,372	10,546	10,129
19-nov-14	9,830	9,832	10,119	10,115	9,974	10,106	9,721	10,131	10,364	10,081	10,002	9,852	10,127	10,292	10,068
21-nov-14	9,611	9,481	9,570	9,812	9,619	9,708	9,345	9,599	9,739	9,598	9,603	9,508	9,432	9,811	9,589
23-nov-14	9,308	9,148	9,435	9,429	9,330	9,445	9,147	9,307	9,450	9,337	9,423	9,374	9,368	9,549	9,429
25-nov-14	10,058	9,883	10,121	10,205	10,067	10,077	9,880	10,054	10,180	10,048	9,898	9,881	10,087	10,297	10,041
27-nov-14	9,862	9,690	10,088	10,143	9,946	9,973	9,867	9,814	10,144	9,950	10,005	9,702	9,728	10,087	9,881
29-nov-14	9,435	9,449	9,420	9,689	9,498	9,595	9,324	9,566	9,642	9,532	9,585	9,395	9,612	9,732	9,581
03-dic-14	9,900	9,925	9,948	10,135	9,977	10,041	9,763	9,935	9,984	9,931	9,932	9,803	10,007	10,096	9,960
05-dic-14	10,228	10,208	10,210	10,418	10,266	10,381	10,142	10,232	10,455	10,303	10,150	10,226	10,340	10,455	10,293
10-dic-14	9,809	9,653	9,807	9,848	9,779	9,713	9,758	9,741	9,864	9,769	9,652	9,647	9,780	9,738	9,704
12-dic-14	10,047	10,043	10,017	10,268	10,094	10,243	10,027	10,024	10,144	10,110	10,123	10,122	10,199	10,296	10,185
15-dic-14	10,255	10,294	10,112	10,474	10,284	10,318	10,115	10,362	10,254	10,262	9,932	9,803	10,007	10,096	9,960
17-dic-14	9,898	10,149	9,985	10,051	10,021	10,042	9,991	10,037	10,039	10,027	10,074	9,976	10,052	10,226	10,082
MEDIA	9,348	9,376	9,470	9,630	9,456	9,466	9,226	9,496	9,628	9,454	9,397	9,271	9,454	9,631	9,438
MÁX.	10,255	10,294	10,210	10,474	10,284	10,381	10,142	10,362	10,455	10,303	10,150	10,226	10,372	10,546	10,293
MÍN.	6,652	6,542	6,447	6,670	6,578	6,571	6,487	6,328	6,679	6,516	6,518	6,444	6,515	6,483	6,490

Anexo 6. Medición de variables para ensayo de materiales textiles (Conductividad Eléctrica)

	T1				Media	T2				Media	T3				Media
	I	II	III	IV		I	II	III	IV		I	II	III	IV	
05-nov-14	61,00	64,10	31,90	63,30	55,08	62,80	61,60	64,20	32,80	55,35	63,00	63,20	63,50	60,20	62,48
06-nov-14	61,30	66,80	64,60	34,80	56,88	63,90	33,20	66,00	65,90	57,25	65,30	60,10	64,60	61,00	62,75
08-nov-14	57,50	58,10	30,40	59,30	51,33	57,40	29,40	57,70	33,80	44,58	48,00	52,50	54,40	26,60	45,38
10-nov-14	54,20	50,60	52,00	46,00	50,70	51,30	52,80	49,40	44,10	49,40	47,00	47,80	48,90	35,20	44,73
12-nov-14	59,30	48,20	47,80	45,00	50,08	38,70	47,70	44,20	38,60	42,30	42,80	47,10	45,80	41,40	44,28
14-nov-14	33,20	22,20	22,30	21,70	24,85	22,40	23,70	21,40	37,80	26,33	21,40	42,50	43,90	38,50	36,58
17-nov-14	25,70	24,00	26,00	25,20	25,23	46,50	26,20	25,00	27,00	31,18	24,10	25,00	23,10	23,60	23,95
19-nov-14	27,90	25,20	25,80	25,30	26,05	23,00	31,30	23,90	22,00	25,05	23,00	23,80	26,00	23,40	24,05
21-nov-14	31,30	27,80	28,80	32,20	30,03	51,80	28,50	28,60	52,70	40,40	28,10	26,70	44,20	28,90	31,98
23-nov-14	27,80	44,60	25,10	25,30	30,70	31,90	39,70	54,90	30,90	39,35	32,70	29,30	60,20	25,80	37,00
25-nov-14	27,80	27,20	22,20	27,00	26,05	25,80	26,60	26,20	25,10	25,93	24,90	27,20	27,50	25,50	26,28
27-nov-14	35,30	32,60	25,60	25,50	29,75	30,50	31,10	40,60	31,50	33,43	30,40	32,60	40,00	29,60	33,15
29-nov-14	33,50	30,70	26,20	30,60	30,25	29,30	28,20	29,30	28,90	28,93	25,10	25,10	31,60	27,80	27,40
03-dic-14	37,00	31,80	32,70	34,40	33,98	41,90	39,90	34,40	31,80	37,00	29,40	29,40	32,40	29,50	30,18
05-dic-14	35,90	33,40	29,70	33,70	33,18	32,20	29,60	31,10	31,60	31,13	27,50	27,40	31,90	30,00	29,20
09-dic-14	36,60	33,10	27,40	32,80	32,48	31,80	28,00	31,70	31,70	30,80	28,10	25,90	29,50	37,50	30,25
10-dic-14	36,40	34,00	31,00	34,00	33,85	33,60	31,90			32,75	29,60	26,80	30,90	31,00	29,58
12-dic-14	37,10	32,70	29,60		33,13	32,10	30,30	33,40	37,10	33,23	28,60	27,00	28,40	29,50	28,38
15-dic-14	36,40	43,90	30,30	35,60	36,55	32,40	42,90	33,10	36,80	36,30	29,40	29,40	32,40	29,50	30,18
17-dic-14	38,10	25,80	31,20	38,10	33,30	34,30	36,20	37,20	34,10	35,45	25,80	32,10	29,50	29,00	29,10
Media	39,67	37,84	32,03	35,25	36,17	38,68	34,94	38,54	35,48	36,81	33,71	35,05	39,44	33,18	35,34
Máximo	61,30	66,80	64,60	63,30	56,88	63,90	61,60	66,00	65,90	57,25	65,30	63,20	64,60	61,00	62,75
Mínimo	25,70	22,20	22,20	21,70	24,85	22,40	23,70	21,40	22,00	25,05	21,40	23,80	23,10	23,40	23,95

Anexo 7. Medición de variables para ensayo de materiales textiles (Sólidos Disueltos Totales)

	T1				Prom	T2				Prom	T3				Prom	T4				Prom
	I	II	III	IV		I	II	III	IV		I	II	III	IV		I	II	III	IV	
05-nov-14	325,00	341,00	169,00	336,00	292,75	334,00	328,00	342,00	174,00	294,50	335,00	337,00	337,00	321,00	332,50	331,00	338,00	339,00	338,00	336,50
06-nov-14	327,00	356,00	344,00	185,00	303,00	340,00	176,00	349,00	349,00	303,50	348,00	320,00	344,00	325,00	334,25	352,00	349,00	291,00	341,00	333,25
08-nov-14	307,00	310,00	162,00	316,00	273,75	304,00	157,00	307,00	156,00	231,00	260,00	278,00	289,00	141,00	242,00	292,00	283,00	269,00	285,00	282,25
10-nov-14	289,00	270,00	276,00	245,00	270,00	273,00	282,00	263,00	234,00	263,00	250,00	256,00	261,00	191,00	239,50	249,00	234,00	249,00	239,00	242,75
12-nov-14	316,00	257,00	254,00	240,00	266,75	213,00	247,00	234,00	205,00	224,75	228,00	251,00	234,00	221,00	233,50	260,00	214,00	243,00	227,00	236,00
14-nov-14	179,00	118,00	118,00	115,00	132,50	119,00	126,00	114,00	200,00	139,75	114,00	226,00	234,00	205,00	194,75	226,00	112,00	224,00	105,00	166,75
17-nov-14	137,00	128,00	138,00	134,00	134,25	246,00	139,00	133,00	144,00	165,50	130,00	133,00	123,00	126,00	128,00	155,00	257,00	138,00	129,00	169,75
19-nov-14	148,00	134,00	137,00	134,00	138,25	122,00	164,00	127,00	118,00	132,75	122,00	126,00	138,00	125,00	127,75	152,00	238,00	137,00	162,00	172,25
21-nov-14	166,00	148,00	154,00	172,00	160,00	276,00	152,00	152,00	281,00	215,25	149,00	142,00	240,00	155,00	171,50	154,00	145,00	162,00	144,00	151,25
23-nov-14	148,00	241,00	133,00	136,00	164,50	172,00	210,00	292,00	141,00	203,75	172,00	156,00	320,00	137,00	196,25	151,00	268,00	248,00	263,00	232,50
25-nov-14	150,00	145,00	118,00	144,00	139,25	137,00	142,00	139,00	133,00	137,75	133,00	119,00	146,00	136,00	133,50	147,00	142,00	151,00	138,00	144,50
27-nov-14	188,00	174,00	136,00	29,40	131,85	162,00	165,00	24,90	150,00	125,48	161,00	174,00	211,00	158,00	176,00	210,00	189,00	384,00	169,00	238,00
29-nov-14	178,00	163,00	139,00	163,00	160,75	155,00	150,00	156,00	154,00	153,75	134,00	134,00	168,00	148,00	146,00	120,00	178,00	182,00	148,00	157,00
03-dic-14	194,00	169,00	174,00	183,00	180,00	22,00	211,00	182,00	170,00	146,25	156,00	155,00	170,00	156,00	159,25					
05-dic-14	191,00	178,00	158,00	179,00	176,50	171,00	158,00	165,00	168,00	165,50	146,00	146,00	170,00	160,00	155,50					
09-dic-14	194,00	176,00	146,00	178,00	173,50	171,00	148,00	168,00	169,00	164,00	149,00	137,00	157,00	201,00	161,00					
10-dic-14	198,00	180,00	164,00	181,00	180,75	181,00	170,00			175,50	157,00	142,00	165,00	164,00	157,00					
12-dic-14	197,00	173,00	157,00		175,67	173,00	160,00	175,00	194,00	175,50	152,00	193,00	149,00	236,00	182,50					
15-dic-14	194,00	239,00	161,00	189,00	195,75	172,00	225,00	176,00	202,00	193,75	156,00	155,00	170,00	156,00	159,25					
17-dic-14	202,00	137,00	168,00	202,00	177,25	182,00	194,00	198,00	180,00	188,50	137,00	171,00	156,00	154,00	154,50					
MEDIA	211,40	201,85	170,30	182,18		196,25	185,20	194,57	185,37		179,45	187,55	209,10	180,80		215,31	226,69	232,08	206,77	
MÁX	327,00	356,00	344,00	336,00		340,00	328,00	349,00	349,00		348,00	337,00	344,00	325,00		352,00	349,00	384,00	341,00	
MÍN	137,00	118,00	118,00	29,40		22,00	126,00	24,90	118,00		114,00	119,00	123,00	125,00		120,00	112,00	137,00	105,00	

Anexo 8. Medición de variables para ensayo de materiales textiles (Absorbancia)

	T1				Prom	T2				Prom	T3				Prom	T4				Prom	
	I	II	III	IV		I	II	III	IV		I	II	III	IV		I	II	III	IV		
05-nov-14	0,038	0,042	0,038	0,041	0,040	0,040	0,039	0,043	0,041	0,041	0,045	0,042	0,038	0,040	0,041	0,041	0,041	0,040	0,040	0,040	0,040
06-nov-14	0,004	0,004	0,004	0,006	0,005	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,007	0,004	0,007	0,007	0,007	0,006	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
08-nov-14	0,064	0,083	0,086	0,112	0,086	0,088	0,072	0,101	0,105	0,092	0,120	0,072	0,136	0,101	0,107	0,127	0,123	0,151	0,147	0,137	0,137
10-nov-14	0,184	0,197	0,225	0,269	0,219	0,251	0,204	0,247	0,252	0,239	0,227	0,177	0,308	0,229	0,235	0,321	0,442	0,296	0,330	0,347	0,347
12-nov-14	0,240	0,329	0,379	0,358	0,326	0,306	0,349	0,362	0,289	0,327	0,327	0,234	0,485	0,279	0,331	0,397	0,546	0,465	0,435	0,461	0,461
14-nov-14	0,286	0,431	0,424	0,507	0,412	0,379	0,386	0,411	0,428	0,401	0,364	0,302	0,621	0,368	0,414	0,413	0,527	0,416	0,499	0,464	0,464
17-nov-14	0,634	0,714	0,721	0,803	0,718	0,772	0,537	0,720	0,709	0,684	0,542	0,506	0,766	0,625	0,610	0,358	0,623	0,496	0,651	0,532	0,532
19-nov-14	0,383	0,702	0,664	0,770	0,630	0,520	0,558	0,604	0,607	0,572	0,563	0,539	0,857	0,648	0,652	0,636	0,762	0,447	0,546	0,598	0,598
21-nov-14	0,271	0,445	0,725	0,709	0,537	0,456	0,269	0,269	0,652	0,412	0,704	0,453	0,453	0,531	0,535	0,724	0,746	0,746	0,491	0,677	0,677
23-nov-14	0,236	0,580	0,690	0,947	0,613	0,457	0,174	0,295	0,789	0,429	0,684	0,364	0,867	0,778	0,673	0,823	0,720	0,358	0,458	0,590	0,590
25-nov-14	0,385	0,746	0,837	0,952	0,730	0,583	0,500	0,305	0,752	0,535	0,785	0,438	0,879	0,804	0,727	0,446	0,919	0,581	0,369	0,579	0,579
27-nov-14	0,258	0,702	0,616	0,817	0,598	0,480	0,377	0,427	0,586	0,468	0,659	0,441	0,904	0,694	0,675	0,345	0,935	0,559	0,197	0,509	0,509
29-nov-14	0,327	0,588	0,661	0,887	0,616	0,650	0,208	0,426	0,597	0,470	0,635	0,311	0,746	0,669	0,590	0,289	0,711	0,461	0,194	0,414	0,414
03-dic-14	0,346	0,277	0,636	0,593	0,463	0,643	0,123	0,318	0,337	0,355	0,304	0,280	0,394	0,365	0,336						
05-dic-14	0,555	0,533	0,766	0,774	0,657	0,799	0,255	0,493	0,576	0,531	0,353	0,524	0,481	0,621	0,495						
09-dic-14	0,614	0,709	1,153	0,847	0,831	0,914	0,562	0,866	0,774	0,779	0,799	0,714	0,829	1,194	0,884						
10-dic-14	0,437	0,411	0,836	0,781	0,616	0,414	0,299	0,378	0,363	0,364	0,484	0,451	0,570	0,443	0,487						
12-dic-14	0,437	0,324	0,771	0,846	0,595	0,509	0,402	0,385	0,437	0,433	0,633	0,559	0,590	0,489	0,568						
15-dic-14	0,627	0,724	1,078	1,128	0,889	1,018	0,662	0,824	1,123	0,907	0,304	0,280	0,394	0,365	0,336						
17-dic-14	0,429	0,545	0,857	0,694	0,631	0,786	0,635	0,423	0,353	0,549	0,735	0,466	0,669	0,390	0,565						
MEDIA	0,338	0,454	0,608	0,642		0,503	0,331	0,395	0,489		0,464	0,358	0,550	0,482		0,379	0,546	0,386	0,335		
MÁX	0,634	0,746	1,153	1,128		1,018	0,662	0,866	1,123		0,799	0,714	0,904	1,194		0,823	0,935	0,746	0,651		
MÍN	0,004	0,004	0,004	0,006		0,004	0,004	0,005	0,005		0,007	0,004	0,007	0,007		0,004	0,003	0,004	0,004		

Anexo 9. Promedios diarios de medición de CO₂ por material textil

	T1				Media	T2				Media	T3				Media	T4				Media
	I	II	III	IV		I	II	III	IV		I	II	III	IV		I	II	III	IV	
06-nov-14	348,50	340,50	340,50	344,50	343,50	352,00	339,00	342,50	345,50	344,75	349,00	344,50	342,00	349,00	346,13	345,00	345,00	341,00	345,50	344,13
07-nov-14	342,00	333,00	338,33	341,33	338,67	339,33	336,33	333,00	337,67	336,58	335,67	334,67	334,33	337,00	335,42	340,00	336,67	336,00	337,00	337,42
08-nov-14	342,00	340,00	338,00	328,00	337,00	340,00	331,00	339,00	331,00	335,25	338,00	335,00	337,00	334,00	336,00	346,00	341,00	330,00	326,00	335,75
09-nov-14	351,00	350,00	354,00	338,00	348,25	348,00	352,00	340,00	341,00	345,25	345,00	348,00	339,00	347,00	344,75	346,00	347,00	346,00	342,00	345,25
10-nov-14	347,67	346,33	343,00	341,33	344,58	345,67	343,67	344,00	343,67	344,25	343,67	343,67	345,00	341,67	343,50	349,67	346,33	341,33	342,00	344,83
11-nov-14	352,67	354,00	344,00	347,00	349,42	352,00	351,67	352,33	347,33	350,83	350,67	349,67	350,00	351,67	350,50	352,33	346,33	344,67	348,33	347,92
12-nov-14	353,00	357,00	349,00	342,33	350,33	352,67	354,00	353,67	340,00	350,08	350,33	349,33	352,00	348,33	350,00	355,67	348,33	350,67	346,00	350,17
13-nov-14	339,33	341,67	336,67	338,33	339,00	338,67	339,67	343,67	337,00	339,75	338,00	341,33	340,33	340,33	340,00	343,67	337,00	338,67	341,00	340,08
14-nov-14	338,33	342,00	342,33	345,00	341,92	339,33	341,00	343,00	343,00	341,58	335,33	339,00	343,33	349,00	341,67	340,67	337,67	344,00	344,00	341,58
15-nov-14	356,00	360,00	360,00	355,00	357,75	354,00	357,00	357,00	359,00	356,75	351,00	351,00	362,00	364,00	357,00	361,00	354,00	358,00	360,00	358,25
16-nov-14	354,00	358,00	334,00	341,00	346,75	351,00	341,00	337,00	337,00	341,50	356,00	346,00	341,00	351,00	348,50	357,00	338,00	338,00	343,00	344,00
17-nov-14	345,67	344,33	342,33	344,33	344,17	342,67	340,00	345,67	342,00	342,58	343,33	339,00	345,67	348,00	344,00	346,33	339,67	343,00	346,33	343,83
19-nov-14	358,33	355,00	344,33	342,67	350,08	357,33	352,00	353,33	342,00	351,17	351,67	347,33	349,33	349,33	349,42	358,33	345,33	347,67	346,67	349,50
20-nov-14	343,33	346,33	335,33	333,33	339,58	341,33	342,67	342,00	331,33	339,33	337,00	340,67	340,33	338,67	339,17	345,33	339,00	337,00	333,67	338,75
21-nov-14	346,33	345,00	342,33	344,33	344,50	349,33	342,33	348,00	340,33	345,00	346,67	343,67	347,00	345,00	345,58	349,33	340,67	345,00	345,67	345,17
22-nov-14	352,00	352,00	341,00	347,00	348,00	350,00	350,00	351,00	342,00	348,25	347,00	347,00	348,00	353,00	348,75	357,00	340,00	345,00	351,00	348,25
23-nov-14	347,00	351,00	341,00	339,00	344,50	346,00	348,00	348,00	340,00	345,50	350,00	340,00	347,00	344,00	345,25	349,00	336,00	344,00	341,00	342,50
24-nov-14	347,33	348,67	339,33	340,00	343,83	345,00	345,33	346,00	337,67	343,50	342,33	344,67	342,67	345,33	343,75	349,67	342,00	341,33	341,67	343,67
25-nov-14	341,67	346,00	339,00	340,33	341,75	339,67	342,00	344,33	334,00	340,00	337,00	340,33	342,67	341,00	340,25	344,67	337,67	339,33	341,00	340,67
26-nov-14	342,67	350,00	340,33	338,00	342,75	343,00	346,00	346,00	339,67	343,67	341,00	346,00	343,00	343,33	343,33	347,33	342,00	343,67	342,33	343,83
27-nov-14	341,67	339,67	338,67	339,33	339,83	342,00	335,00	339,67	338,67	338,83	341,00	338,00	338,00	340,00	339,25	343,00	341,33	337,33	339,00	340,17





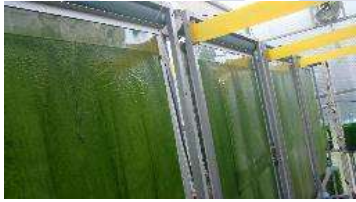
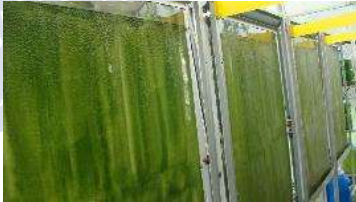
28-nov-14	345,33	344,67	336,00	334,33	340,08	343,67	344,00	342,33	333,67	340,92	342,67	343,33	341,00	339,33	341,58	348,33	340,00	341,33	337,67	341,83
29-nov-14	356,00	360,00	349,00	347,00	353,00	351,00	359,00	359,00	346,00	353,75	350,00	358,00	358,00	351,00	354,25	359,00	355,00	351,00	348,00	353,25
30-nov-14	348,00	349,00	346,00	341,00	346,00	347,00	346,00	351,00	339,00	345,75	340,00	347,00	350,00	348,00	346,25	350,00	348,00	341,00	347,00	346,50
01-dic-14	335,50	338,00	335,00	333,00	335,38	338,50	336,00	336,00	331,50	335,50	336,00	337,00	336,50	334,00	335,88	340,00	336,00	334,50	333,50	336,00
02-dic-14	345,00	347,50	345,00	343,00	345,13	345,50	346,00	347,00	341,50	345,00	344,00	344,00	343,00	345,00	344,00	345,00	344,00	344,00	345,00	344,50
03-dic-14	344,00	348,00	342,33	339,33	343,42	344,00	346,67	346,67	338,00	343,83	344,33	343,33	345,00	341,67	343,58	345,33	340,33	343,00	339,33	342,00
04-dic-14	333,50	336,00	332,50	333,00	333,75	338,00	335,50	337,50	331,00	335,50	334,50	334,00	338,50	335,50	335,63	335,00	330,50	335,50	333,50	333,63
05-dic-14	341,00	338,00	334,00	336,67	337,42	339,33	336,67	338,67	334,67	337,33	340,00	334,00	339,00	337,67	337,67	341,00	334,33	337,00	337,33	337,42
06-dic-14	356,00	357,00	345,00	349,00	351,75	351,00	354,00	356,00	344,00	351,25	348,00	350,00	351,00	355,00	351,00	358,00	347,00	348,00	350,00	350,75
07-dic-14	347,00	357,00	348,00	348,00	350,00	352,00	350,00	356,00	347,00	351,25	349,00	351,00	351,00	355,00	351,50	358,00	350,00	356,00	356,00	355,00
08-dic-14	337,00	337,00	333,00	332,00	334,75	333,50	338,50	337,00	330,50	334,88	329,50	339,00	336,00	334,50	334,75	339,50	333,50	336,00	332,00	335,25
09-dic-14	340,00	338,50	337,00	337,50	338,25	339,50	336,50	340,00	335,50	337,88	335,50	335,50	338,00	341,00	337,50	340,50	338,50	336,50	338,50	338,50
10-dic-14	341,33	342,33	337,33	335,00	339,00	340,00	340,67	340,67	334,00	338,83	337,00	340,00	337,33	339,00	338,33	341,00	338,33	337,00	339,00	338,83
11-dic-14	347,33	348,67	342,00	343,00	345,25	344,33	347,33	344,67	338,67	343,75	344,33	344,67	343,67	344,33	344,25	347,33	343,33	340,50	343,00	343,54
12-dic-14	347,00	347,00	345,00	341,67	345,17	346,00	345,67	345,67	341,33	344,67	347,00	344,67	346,00	344,00	345,42					
13-dic-14	352,00	353,00	346,00	345,00	349,00	350,00	350,00	348,00	348,00	349,00	351,00	349,00	347,00	349,00	349,00					
14-dic-14	351,00	351,00	350,00	344,00	349,00	348,00	350,00	345,00	343,00	346,50	349,00	349,00	346,00	347,00	347,75					
15-dic-14	335,00	334,67	333,67	332,33	333,92	333,33	333,33	336,33	332,00	333,75	333,33	333,33	335,33	333,00	333,75					
16-dic-14	345,33	344,00	343,33	343,33	344,00	343,00	343,33	344,00	341,00	342,83	341,67	343,33	342,67	344,00	342,92					
17-dic-14	350,00	353,00	348,00	348,00	349,75	351,00	352,00	351,00	349,00	350,75	348,00	349,00	350,00	349,00	349,00					
Media	346,04	346,95	341,75	340,89	343,91	345,07	344,41	345,16	339,74	343,59	343,28	343,37	344,02	344,58	343,81	347,86	341,71	342,09	342,37	343,51
Máxima	358,33	360,00	360,00	355,00	357,75	357,33	359,00	359,00	359,00	356,75	356,00	358,00	362,00	364,00	357,00	361,00	355,00	358,00	360,00	358,25
Mínima	333,50	333,00	332,50	328,00	333,75	333,33	331,00	333,00	330,50	333,75	329,50	333,33	334,33	333,00	333,75	335,00	330,50	330,00	326,00	333,63

Anexos Capítulo 3

Anexo 1. Preparación de Unidades experimentales previo al ensayo de dosis de nutriente en paneles verticales

<p>Paneles verticales previo a la siembra de algas unicelulares</p> 	<p>Tanque en donde se preparó el medio de cultivo con las algas unicelulares</p> 
<p>Preparación de la solución nutritiva</p> 	<p>Distribución homogénea en cada unidad experimental</p> 
<p>Distribución en las láminas verticales de la solución</p> 	<p>Lámina humedecida en su totalidad</p> 

















Anexo 2. Desarrollo de crecimiento celular en la fase de preparación de unidades experimentales en ensayo de dosis de nutriente en paneles verticales

<p>Paneles verticales previo a la siembra (Día 0: 3 de junio 2016)</p> 	<p>Paneles verticales posteriores a la siembra) (Día 1: 4 de junio del 2016)</p> 
<p>Vista general del ensayo (Día 1: 4 de junio 2016)</p> 	<p>Paneles verticales al (Día11: 13 de junio 2016)</p> 
<p>Paneles verticales (13 de junio 2016)</p> 	<p>Paneles verticales luego de la primera cosecha (22 de junio del 2016)</p> 

Anexo 3. Distribución de las unidades experimentales en el ensayo de concentraciones de CO₂ en paneles verticales

Distribución de las unidades experimentales en el experimento



C1	C3	C4	C2
13 	9 	5 	1 
14 	10 	6 	2 
15 	11 	7 	3 
16 	12 	8 	4 

Anexo 4 Comunicación sobre la identificación de algas unicelulares en Fotobiorreactor

PUCE/EXTENSIÓN IBARRA
LABORATORIO DE MICROALGAS

ANÁLISIS DE MUESTRA DE CULTIVO DE MICROALGAS
FECHA: 9 de mayo de 2016

Resultados:

1.-Especies de microalgas observadas:

- a.-*Scenedesmus dimorfus*: cenobios entre 4 y 8 células en forma de empanadas. Abundantes.
 - b.-*Scenedesmus* sp.: células de mayo tamaño, aisladas o en pares. Moderada presencia.
 - c.-*Navícula* sp.: microalga del grupo de las diatomeas. Color pardo-amarillento en forma navicular en cara valvar y en forma rectangular en cara lateral o cingular. Presencia de escasa.
- 2.-Recuento de microalgas observadas en cámara de Neubauer.

a.-De un total de $1,7 \times 10^6$ microalgas/ml; el 92.89% corresponde a las microalgas del género *Scenedesmus*; mientras que el 7,1% pertenecen a la diatomea del género *Navícula*.

3.-Observaciones:

El cultivo no presentó abundancia en bacterias, ni protozoarios, levaduras, ni hongos.

4.-Recomendaciones:

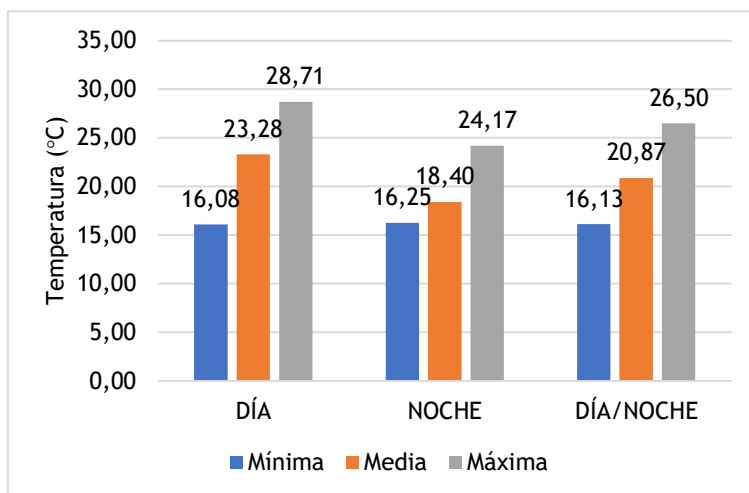
A fin de revisar la población de microalgas que se ha adaptado a los fotobiorreactores, se debe muestrear todas las unidades de cultivo, a fin de determinar la población de *Scenedesmus dimorfus*, de *Scenedesmus* sp. y de *Navícula* sp., en cada uno de estas unidades. Y deducir cual es la más predominante. Además, se debe monitorear para descartar presencia de otros microorganismos.

Nota:

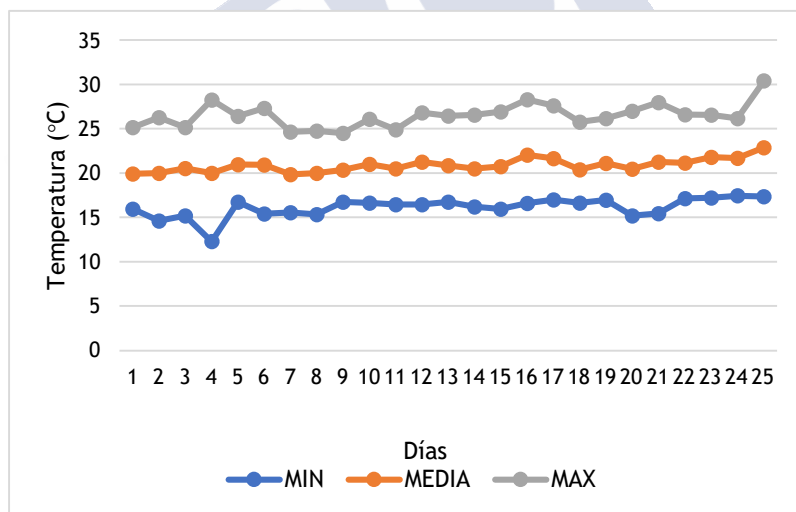
- a.- Las observaciones al microscopio y el recuento de las microalgas en la cámara de Neubauer, se realizó en uno de los laboratorios de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la ESPE, sede El Girón.
- b.-Las microalgas fueron identificadas por la M.Sc. Mónica Rodríguez de la Universidad Autónoma de Mexico/Iztapalapa; a través de fotografías realizadas en dicho laboratorio.

Profesores: Ever Morales y María Fernanda Guevara (UPS)

Anexo 5. Condiciones ambientales en el ensayo con fotobiorreactor laminar



Promedios de temperatura (°C) durante la fase del ensayo de concentración de CO₂



Promedios del comportamiento de la temperatura en el día/noche

Anexo 6. Comportamiento diario de variables evaluadas en fotobiorreactores

Evolución del pH durante el experimento

Fecha	Día	C1	C2	C3	C4	α (0.05)	CV(%)
29-ene	1	8.278	8.331	8.180	8.229	*	0.73
30-ene	2	8.334	8.258	8.328	8.268	NS	1.57
31-ene	3	8.166	8.132	8.236	8.221	NS	0.79
1-feb	4	8.360	8.119	8.259	8.134	*	0.64
2-feb	5	8.213	8.304	8.143	8.236	*	0.53
5-feb	8	8.335	8.267	8.233	8.190	*	0.59
6-feb	9	8.213	8.281	8.245	8.239	NS	0.52
7-feb	10	8.341	8.275	8.307	8.403	NS	0.92
8-feb	11	8.201	8.241	8.198	8.205	NS	0.40
9-feb	12	8.525	8.591	8.502	8.566	*	0.41
10-feb	13	8.456	8.433	8.171	8.183	*	0.80
11-feb	14	8.551	8.805	8.376	8.504	*	1.06
12-feb	15	8.354	8.063	8.220	8.160	*	0.66
13-feb	16	8.326	8.357	8.323	8.350	NS	0.53
14-feb	17	8.650	8.362	8.552	8.421	*	0.47
15-feb	18	8.126	8.161	8.155	8.012	NS	1.22
16-feb	19	8.333	8.365	8.120	8.173	*	1.21
17-feb	20	8.198	8.217	8.051	8.050	*	1.14
18-feb	21	7.808	8.117	7.742	7.780	*	1.55
19-feb	22	8.518	8.383	8.269	8.305	*	1.09
20-feb	23	8.201	8.231	8.282	8.286	*	0.38
21-feb	24	8.183	8.183	8.192	8.150	NS	0.40
22-feb	25	8.174	8.118	7.970	8.033	*	1.00
23-feb	26	8.221	8.378	8.228	8.429	*	1.16
24-feb	27	8.054	8.052	7.922	8.030	NS	1.19
25-feb	28	7.830	7.958	7.792	7.844	NS	1.07
26-feb	29	7.763	8.043	7.708	7.798	*	0.94
27-feb	30	8.336	8.077	8.251	8.205	*	0.95
28-feb	31	8.261	8.280	8.331	8.383	*	0.35
29-feb	32	8.816	8.739	8.699	8.896	NS	1.24
1-mar	33	8.213	8.388	8.117	8.305	*	0.95
2-mar	34	8.276	8.187	8.214	8.224	*	0.35
3-mar	35	8.193	8.355	8.219	8.362	*	0.57
4-mar	36	8.655	8.520	8.483	8.564	*	0.78
5-mar	37	9.053	8.867	8.960	8.990	*	0.67
6-mar	38	8.664	8.774	8.703	8.764	NS	0.99
7-mar	39	8.330	8.446	8.318	8.366	NS	0.92
8-mar	40	8.475	8.564	8.468	8.641	NS	1.05
9-mar	41	8.556	8.571	8.594	8.618	NS	0.50
10-mar	42	8.268	8.361	8.273	8.361	*	0.48
11-mar	43	8.813	8.678	8.754	8.874	NS	2.10
12-mar	44	8.534	8.556	8.544	8.571	NS	0.43
13-mar	45	8.560	8.635	8.490	8.570	*	0.55
14-mar	46	8.522	8.453	8.421	8.521	NS	1.34
15-mar	47	8.763	8.598	8.606	8.618	NS	2.10
16-mar	48	8.487	8.455	8.354	8.527	NS	1.61

	Fase de crecimiento
	Fase de producción
	Fase de cosecha

C1= Tratamiento no enriquecido con CO₂, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂, = No significativo, * Significativo 5%, CV= Coeficiente de variación.

Evolución de la conductividad eléctrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) durante el experimento

Fecha	Día	C1	C2	C3	C4	α (0.05)	CV(%)
29-ene	1	522.76	520.10	543.28	523.34	NS	2.59
30-ene	2	509.99	506.21	528.10	509.18	*	1.85
31-ene	3	529.77	524.94	576.49	530.27	*	2.45
1-feb	4	521.77	521.68	568.20	526.22	*	2.73
2-feb	5	501.51	498.65	550.37	502.91	*	3.33
3-feb	6	430.96	422.60	489.36	440.85	*	4.54
4-feb	7	425.45	422.32	483.97	435.94	*	3.72
5-feb	8	654.68	669.79	694.07	678.43	*	1.92
6-feb	9	641.51	643.15	653.81	641.91	NS	2.11
7-feb	10	622.24	607.24	618.71	609.02	NS	1.24
8-feb	11	587.10	588.55	618.87	589.36	*	1.87
9-feb	12	555.90	575.15	596.01	578.61	NS	3.16
10-feb	13	558.43	549.70	600.30	578.54	*	3.97
11-feb	14	509.90	518.83	564.38	541.41	*	3.54
12-feb	15	733.46	748.39	774.41	769.69	NS	3.10
13-feb	16	722.63	727.94	766.94	750.99	NS	2.86
14-feb	17	714.34	713.51	759.26	729.88	*	2.87
15-feb	18	692.67	690.52	718.86	700.23	NS	1.98
16-feb	19	657.74	653.88	688.75	676.49	NS	2.77
17-feb	20	648.95	650.03	661.95	659.07	NS	2.19
18-feb	21	616.63	608.42	601.17	602.84	NS	1.83
19-feb	22	806.67	828.71	812.13	813.15	NS	1.82
20-feb	23	780.41	798.64	798.29	795.72	NS	1.15
21-feb	24	756.95	775.83	786.39	798.43	NS	2.43
22-feb	25	738.01	738.08	756.70	756.86	NS	2.36
23-feb	26	705.78	718.90	723.40	732.27	NS	2.68
24-feb	27	695.25	713.71	729.85	724.75	NS	2.60
25-feb	28	661.45	667.32	666.65	669.85	NS	2.22
26-feb	29	863.45	880.34	877.71	882.39	NS	2.27
27-feb	30	839.59	872.92	876.49	881.47	NS	2.59
28-feb	31	810.71	809.78	838.13	841.50	NS	2.67
29-feb	32	798.44	783.00	803.76	803.29	NS	1.59
1-mar	33	768.51	763.53	775.21	774.10	NS	0.79
2-mar	34	765.82	758.95	758.75	763.00	NS	0.65
3-mar	35	721.29	713.14	699.60	694.78	*	1.31
4-mar	36	941.79	984.33	935.74	937.65	*	1.68
5-mar	37	928.19	974.12	935.08	936.62	*	1.71
6-mar	38	922.18	962.52	929.20	928.41	*	1.55
7-mar	39	887.47	902.62	888.86	893.74	*	0.73
8-mar	40	826.31	846.97	808.20	832.63	*	1.46
9-mar	41	818.97	796.44	798.86	797.98	NS	1.51
10-mar	42	791.03	769.09	757.20	755.56	NS	2.27
11-mar	43	1015.61	997.29	996.89	988.34	NS	1.18
12-mar	44	999.49	992.39	996.08	984.59	NS	0.91
13-mar	45	991.29	983.56	984.34	980.40	NS	0.91
14-mar	46	1047.98	1049.00	1041.13	1060.24	NS	1.98

C1= Tratamiento no enriquecido con CO₂, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂, = No significativo, * Significativo 5%, CV= Coeficiente de variación.

Comportamiento de los sólidos disueltos totales (mg L⁻¹)

Fecha	Día	C1	C2	C3	C4	α (0,05)	CV(%)
29-ene	1	278.00	276.75	293.25	282.75	NS	3.07
30-ene	2	274.00	271.25	270.50	274.50	NS	1.38
31-ene	3	281.50	287.75	315.00	287.75	*	4.91
1-feb	4	283.25	287.00	321.00	287.00	*	4.25
2-feb	5	268.75	265.50	294.50	268.25	*	3.16
3-feb	6	229.25	225.00	263.50	234.75	*	4.74
4-feb	7	226.25	230.25	257.50	233.25	*	4.05
5-feb	8	354.00	356.50	371.00	360.00	*	1.24
6-feb	9	377.75	376.75	383.75	375.00	NS	1.35
7-feb	10	351.00	358.50	353.75	365.25	NS	1.87
8-feb	11	312.00	330.25	345.00	326.75	*	3.60
9-feb	12	296.25	306.00	316.00	307.75	NS	3.09
10-feb	13	299.25	298.75	320.00	310.25	NS	3.91
11-feb	14	271.50	276.00	298.75	288.00	*	3.57
12-feb	15	392.50	398.75	413.25	409.75	NS	3.34
13-feb	16	386.50	390.00	408.50	399.50	NS	2.58
14-feb	17	380.50	381.25	404.50	388.00	*	2.77
15-feb	18	370.50	372.00	384.50	373.25	NS	2.36
16-feb	19	350.75	347.75	366.50	359.75	NS	2.84
17-feb	20	342.00	346.25	352.25	351.00	NS	2.37
18-feb	21	328.25	323.00	319.50	320.00	NS	1.86
19-feb	22	428.50	440.75	432.50	432.75	NS	2.22
20-feb	23	416.25	425.50	428.25	436.25	*	1.11
21-feb	24	402.75	411.75	418.75	425.25	NS	2.56
22-feb	25	393.00	397.25	403.25	403.25	NS	2.39
23-feb	26	375.50	382.75	385.00	389.75	NS	2.75
24-feb	27	369.00	380.75	382.00	386.00	NS	2.41
25-feb	28	352.25	354.50	355.00	355.50	NS	2.14
26-feb	29	460.25	470.00	466.50	470.25	NS	2.37
27-feb	30	448.00	464.75	465.00	468.50	NS	2.72
28-feb	31	434.00	431.50	444.75	448.50	NS	2.59
29-feb	32	423.25	416.75	426.50	425.25	NS	1.64
1-mar	33	409.25	406.75	411.75	412.75	NS	0.82
2-mar	34	409.25	404.25	404.00	407.00	NS	0.69
3-mar	35	384.25	379.25	372.25	370.00	*	1.33
4-mar	36	502.00	524.00	498.25	499.25	*	1.64
5-mar	37	494.00	523.50	497.25	497.25	*	1.47
6-mar	38	486.00	512.75	487.00	492.25	*	1.71
7-mar	39	458.50	473.50	438.00	458.00	*	2.58
8-mar	40	439.75	439.75	431.00	444.25	NS	1.69
9-mar	41	436.25	422.50	425.00	426.25	NS	1.74
10-mar	42	420.50	407.00	402.75	401.75	NS	2.76
11-mar	43	541.25	532.25	530.00	527.50	NS	1.22
12-mar	44	530.25	530.75	526.25	499.00	NS	4.14
13-mar	45	525.00	519.75	522.50	517.00	NS	0.99

C1= Tratamiento no enriquecido con CO₂, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm CO₂, = No significativo, * Significativo 5%, CV= Coeficiente de variación.

Comportamiento de la resistividad (mV)

Fecha	Día	C1	C2	C3	C4	α (0.05)	CV(%)	Media	mV ¹
29-ene	1	1.92	1.92	1.83	1.90	NS	3.09	1.89	
30-ene	2	1.93	1.95	1.89	1.95	NS	1.76	1.93	
31-ene	3	1.88	1.89	1.76	1.86	NS	3.98	1.85	
1-feb	4	1.89	1.86	1.75	1.85	NS	4.42	1.84	
2-feb	5	2.01	2.01	1.83	1.99	*	3.32	1.96	
3-feb	6	2.34	2.38	2.03	2.27	*	4.90	2.25	
4-feb	7	2.36	2.33	2.07	2.29	*	4.12	2.26	
5-feb	8	1.51	1.49	1.43	1.47	*	1.61	1.47	0.79
6-feb	9	1.48	1.45	1.43	1.48	NS	2.59	1.46	
7-feb	10	1.49	1.51	1.50	1.51	NS	1.58	1.50	
8-feb	11	1.70	1.66	1.60	1.64	NS	3.05	1.65	
9-feb	12	1.80	1.74	1.67	1.73	NS	3.61	1.74	
10-feb	13	1.80	1.81	1.68	1.72	NS	4.87	1.75	
11-feb	14	2.01	1.92	1.81	1.85	*	3.56	1.90	
12-feb	15	1.97	1.93	1.78	1.85	*	3.64	1.88	
13-feb	16	1.36	1.34	1.29	1.30	NS	3.43	1.32	0.56
14-feb	17	1.44	1.35	1.32	1.35	*	3.67	1.37	
15-feb	18	1.40	1.40	1.32	1.37	*	2.68	1.37	
16-feb	19	1.45	1.46	1.40	1.43	*	1.68	1.44	
17-feb	20	1.52	1.53	1.46	1.48	NS	2.79	1.50	
18-feb	21	1.53	1.54	1.51	1.52	NS	2.40	1.52	
19-feb	22	1.62	1.65	1.66	1.66	NS	1.83	1.65	
20-feb	23	1.24	1.21	1.23	1.23	NS	2.01	1.23	0.42
21-feb	24	1.28	1.24	1.26	1.25	*	0.68	1.26	
22-feb	25	1.32	1.29	1.27	1.25	NS	2.57	1.29	
23-feb	26	1.42	1.39	1.39	1.37	NS	2.71	1.39	
24-feb	27	1.44	1.42	1.39	1.38	NS	2.70	1.41	
25-feb	28	1.51	1.50	1.50	1.50	NS	2.38	1.50	
26-feb	29	1.16	1.14	1.14	1.13	NS	2.37	1.14	0.36
27-feb	30	1.16	1.15	1.15	1.14	NS	2.84	1.15	
28-feb	31	1.23	1.24	1.20	1.19	NS	2.62	1.21	
29-feb	32	1.25	1.28	1.25	1.24	NS	2.01	1.25	
1-mar	33	1.30	1.31	1.29	1.29	NS	0.78	1.30	
2-mar	34	1.30	1.32	1.32	1.31	*	0.61	1.31	
3-mar	35	1.39	1.40	1.43	1.44	*	1.36	1.42	
4-mar	36	1.06	1.02	1.07	1.07	*	1.57	1.05	0.36
5-mar	37	1.08	1.02	1.07	1.07	*	1.61	1.06	
6-mar	38	1.09	1.03	1.09	1.08	*	1.40	1.07	
7-mar	39	1.13	1.10	1.16	1.13	*	1.43	1.13	
8-mar	40	1.21	1.19	1.24	1.20	*	1.32	1.21	
9-mar	41	1.22	1.25	1.25	1.25	NS	1.48	1.24	
10-mar	42	1.27	1.30	1.32	1.33	NS	2.52	1.30	
11-mar	43	0.99	1.00	1.01	1.01	*	1.09	1.00	0.30
12-mar	44	1.01	1.00	1.00	1.02	*	1.05	1.01	
13-mar	45	1.01	1.02	1.03	1.03	*	0.81	1.02	

¹= Disminución de Resistividad tras la cosecha y adición de nutriente
 C1= Tratamiento no enriquecido con CO₂, C2= 500 ppm CO₂, C3= 1000 ppm CO₂, C4= 1500 ppm
 CO₂, = No significativo, * Significativo 5%, CV= Coeficiente de variación.

Comportamiento del contenido de Sal (PPT)

















Fecha	Día	C1	C2	C3	C4	α (0.05)	CV(%)	Media	PPT
29-ene	1	0.25	0.25	0.27	0.25	*	0.73	0.26	
30-ene	2	0.24	0.24	0.26	0.24	NS	1.57	0.24	
31-ene	3	0.26	0.26	0.29	0.26	NS	0.79	0.26	
1-feb	4	0.26	0.26	0.29	0.26	*	0.64	0.26	
2-feb	5	0.24	0.24	0.27	0.24	*	0.53	0.25	
3-feb	6	0.21	0.20	0.24	0.21	NS	0.65	0.21	
4-feb	7	0.20	0.20	0.23	0.21	*	0.48	0.21	
5-feb	8	0.32	0.33	0.34	0.33	*	0.59	0.33	0.12
6-feb	9	0.31	0.31	0.31	0.31	NS	0.52	0.31	
7-feb	10	0.31	0.30	0.30	0.31	NS	0.92	0.30	
8-feb	11	0.29	0.29	0.29	0.29	NS	0.40	0.29	
9-feb	12	0.27	0.28	0.29	0.28	*	0.41	0.28	
10-feb	13	0.27	0.27	0.29	0.28	*	0.80	0.27	
11-feb	14	0.24	0.25	0.27	0.26	*	1.06	0.25	
12-feb	15	0.36	0.37	0.38	0.38	*	0.66	0.37	0.11
13-feb	16	0.36	0.36	0.38	0.37	NS	0.53	0.36	
14-feb	17	0.35	0.35	0.37	0.36	*	0.47	0.35	
15-feb	18	0.33	0.34	0.35	0.34	NS	1.22	0.34	
16-feb	19	0.32	0.32	0.33	0.33	*	1.21	0.32	
17-feb	20	0.31	0.31	0.32	0.32	*	1.14	0.32	
18-feb	21	0.30	0.29	0.29	0.29	*	1.55	0.29	
19-feb	22	0.40	0.40	0.40	0.40	*	1.09	0.40	0.11
20-feb	23	0.38	0.39	0.39	0.39	*	0.38	0.39	
21-feb	24	0.37	0.38	0.38	0.39	NS	0.40	0.38	
22-feb	25	0.36	0.36	0.37	0.37	*	1.00	0.37	
23-feb	26	0.34	0.35	0.35	0.36	*	1.16	0.35	
24-feb	27	0.34	0.35	0.35	0.35	NS	1.19	0.35	
25-feb	28	0.32	0.32	0.32	0.32	NS	1.07	0.32	
26-feb	29	0.42	0.43	0.43	0.43	*	0.94	0.43	0.11
27-feb	30	0.41	0.43	0.43	0.43	*	0.95	0.42	
28-feb	31	0.41	0.40	0.41	0.41	*	0.35	0.41	
29-feb	32	0.39	0.38	0.39	0.39	NS	1.24	0.39	
1-mar	33	0.37	0.37	0.38	0.38	*	0.95	0.38	
2-mar	34	0.37	0.37	0.37	0.37	*	0.35	0.37	
3-mar	35	0.35	0.35	0.34	0.34	*	0.57	0.34	
4-mar	36	0.47	0.49	0.46	0.46	*	0.78	0.47	0.13
5-mar	37	0.47	0.48	0.46	0.46	*	0.67	0.47	
6-mar	38	0.46	0.47	0.45	0.45	NS	0.99	0.46	
7-mar	39	0.43	0.44	0.43	0.43	NS	0.92	0.43	
8-mar	40	0.40	0.41	0.40	0.41	NS	1.05	0.40	
9-mar	41	0.40	0.39	0.39	0.39	NS	0.50	0.39	
10-mar	42	0.38	0.38	0.37	0.37	*	0.48	0.37	
11-mar	43	0.50	0.49	0.49	0.49	NS	2.10	0.49	0.12
12-mar	44	0.50	0.49	0.49	0.49	NS	0.43	0.49	
13-mar	45	0.49	0.48	0.48	0.48	*	0.55	0.48	

¹= Incremento del contenido de Sal tras la cosecha y adición de nutriente

Anexo 7. Estado de las unidades fotobiorreactoras en la primera cosecha en el ensayo de concentraciones de CO₂ en paneles verticales

Estado de las unidades experimentales en la primera cosecha



















C1 13	C3 9	C4 5	C2 1
			
			
			
			

Anexo 8. Estado de las unidades fotobiorreactoras al finalizar las cosechas en el ensayo de concentraciones de CO₂ en paneles verticales

Estado de las unidades experimentales al finalizar las cosechas



C1 13	C3 9	C4 5	C2 1
			
			
			
			

Anexos Capítulo 4

Anexo 1. Porcentaje de germinación en semillas de lechuga a diferentes concentraciones de *Scenedesmus* y temperaturas (C0: sin algas; C1: 2×10^7 células ml^{-1} ; C2: 4×10^7 células ml^{-1} ; C3: 6×10^7 células ml^{-1}).

Temperatura de la cámara de germinación	Concentración de microalgas	Germinación Día 2 (%)	Germinación Día 3 (%)
A 15° C	C0	10	100
	C1	30	100
	C2	12,5	100
	C3	7,5	100
A 20° C	C0	97,5	100
	C1	100	100
	C2	100	100
	C3	100	100
A 25° C	C0	100	100
	C1	100	100
	C2	100	100
	C3	100	100

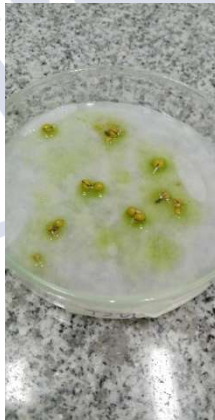
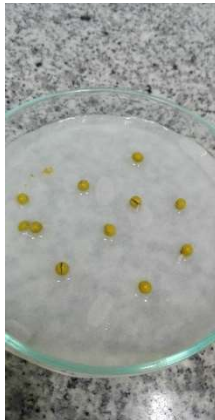
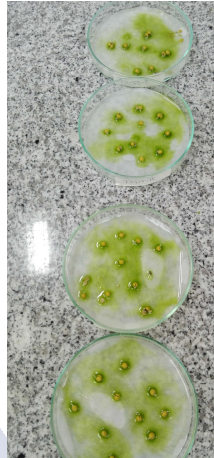
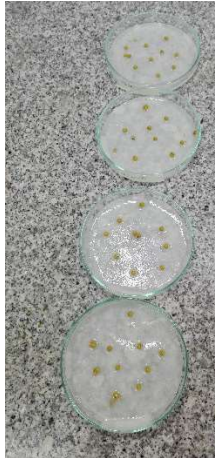
Anexo 2. Aplicación de concentraciones de microalgas

C0 (sin algas)

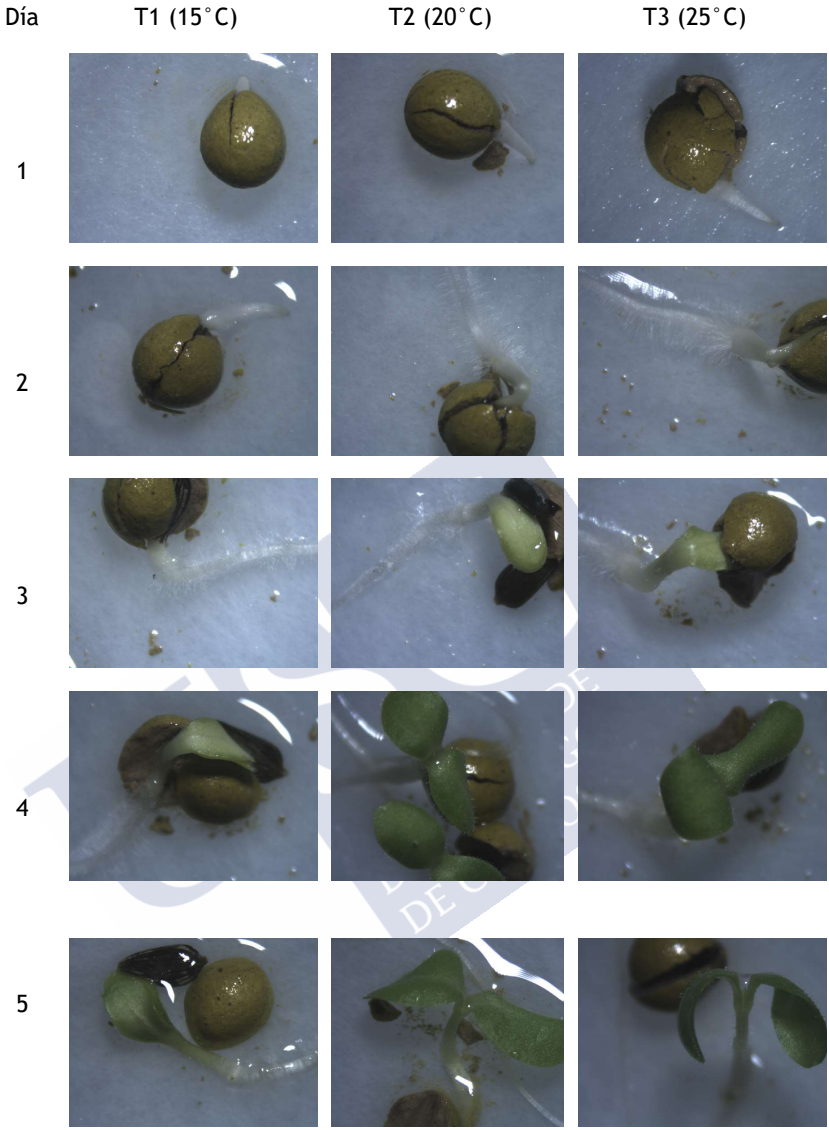
C1 (2×10^7 células ml^{-1})

C2 (4×10^7 células ml^{-1})

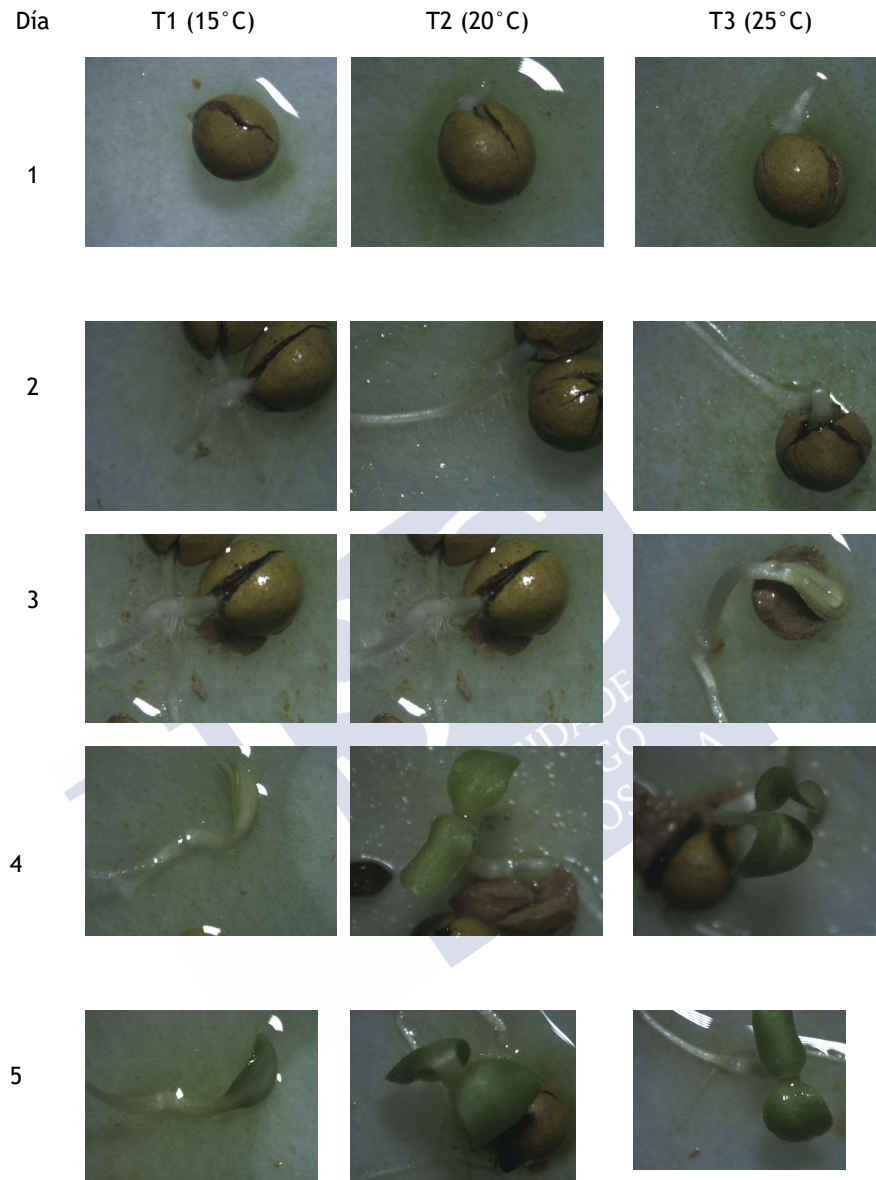
C3 (6×10^7 células ml^{-1})



Anexo 3. Germinación de lechuga sin aplicación de concentraciones de microalgas con 3 temperaturas



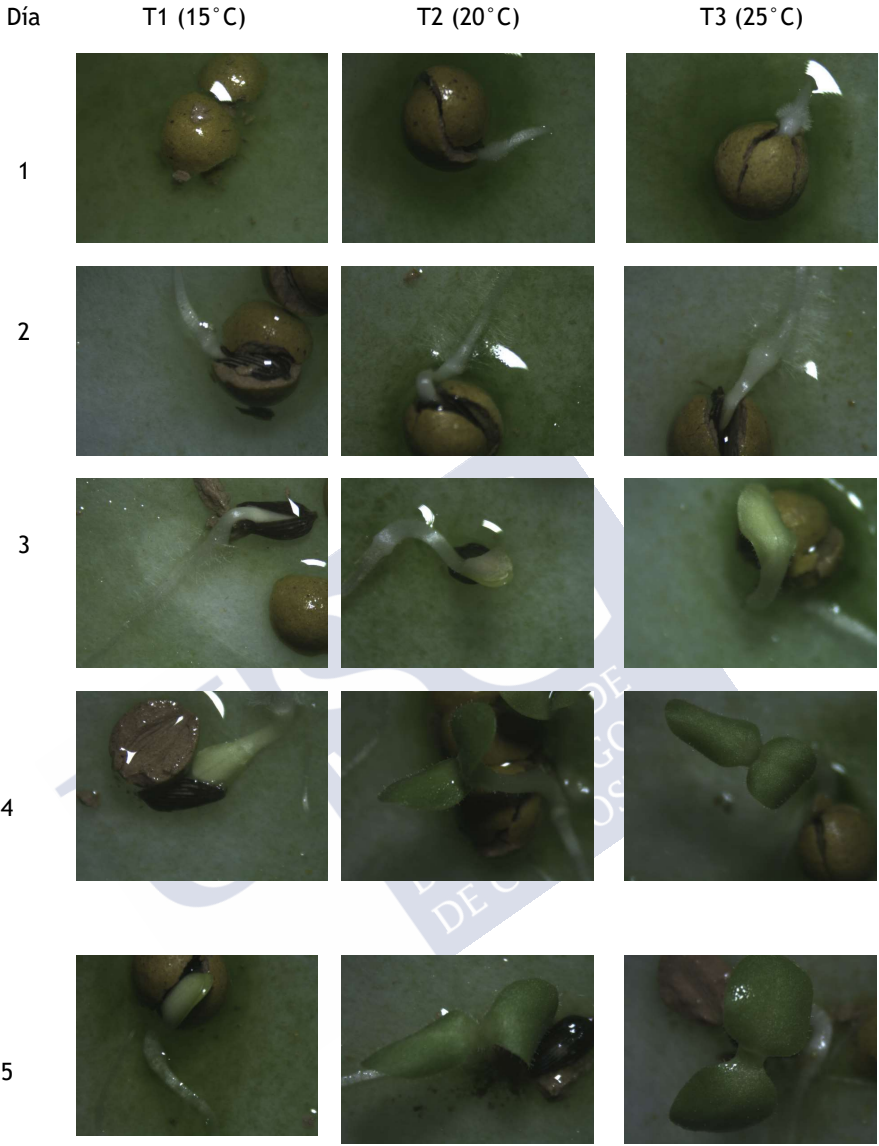
Anexo 4. Germinación de lechuga con aplicación de concentraciones de microalgas (C1: 2×10^7 células ml^{-1}) con 3 temperaturas



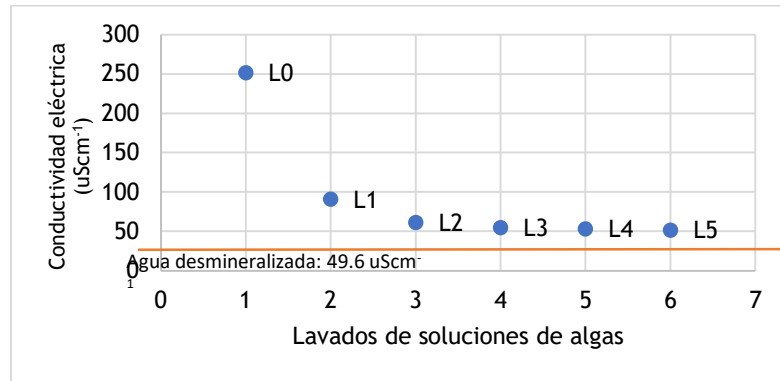
Anexo 5. Germinación de lechuga con aplicación de concentraciones de microalgas (C2: 4×10^7 células ml^{-1}) con 3 temperaturas



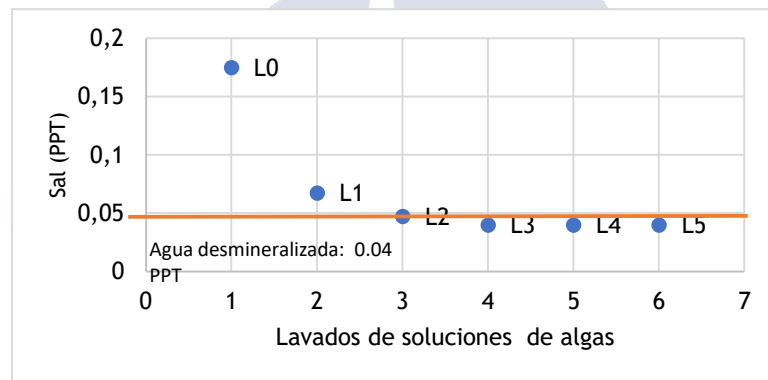
Anexo 6. Germinación de lechuga con aplicación de concentraciones de microalgas (C3: 6×10^7 células ml^{-1}) con 3 temperaturas



Anexo 7. Lavado de microalgas

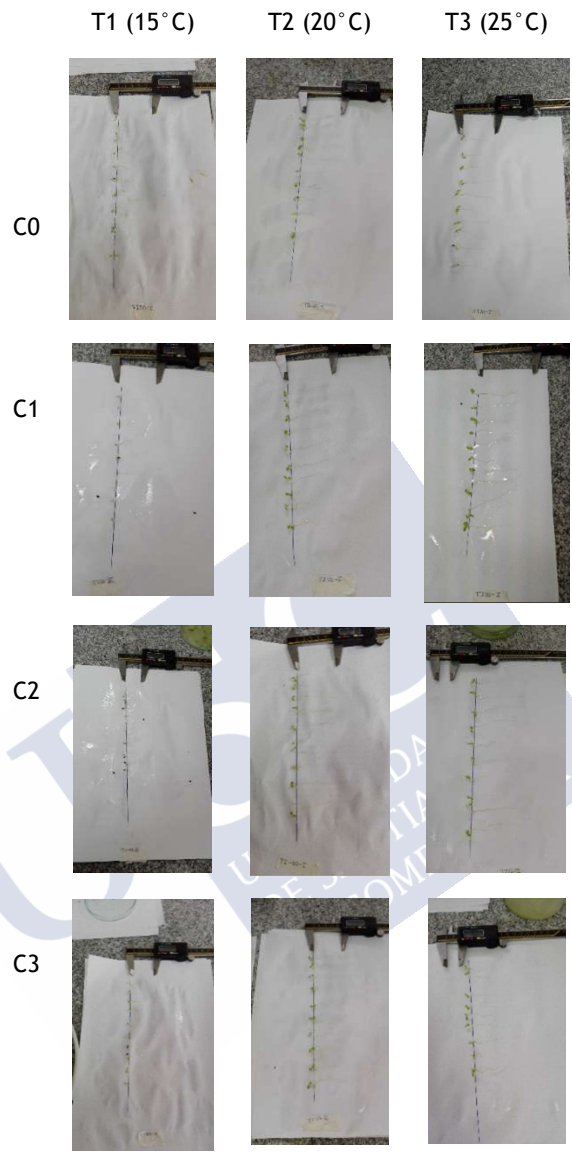


Valor de la conductividad eléctrica tras lavados con agua destilada, la línea roja expresa el valor de la conductividad eléctrica del agua destilada (L0= previo al lavado, L1=lavado 1, L2=Lavado 2, L3= lavado 3, L4= Lavado 4, L5= lavado5)



Valor de sal tras lavados con agua destilada, la línea roja expresa el valor de la sal del agua destilada (L0= previo al lavado, L1=lavado 1, L2=Lavado 2, L3= lavado 3, L4= Lavado 4, L5= lavado 5)

Anexo 8. Medición de longitud de plántula y radícula

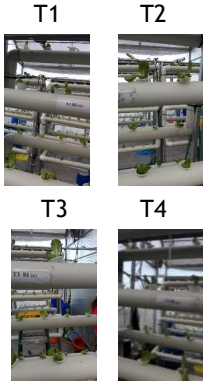


Anexo 9. Instalación de sistema hidropónico

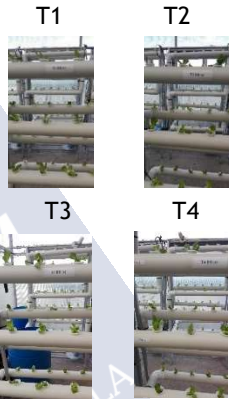
 <p>Distribución de las unidades experimentales en el invernadero</p>	 <p>Vista de espacios entre caminos para el correcto desarrollo de las plantas</p>
 <p>Vista parcial de un bloque constituido por 4 unidades experimentales (cada unidad corresponde a un tratamiento)</p>	 <p>Tubería de 2 pulgadas instalada en la parte inferior para la conducción de la solución nutritiva al tanque de almacenamiento</p>
 <p>Tanque plástico de almacenamiento de solución nutritiva de 20 litros</p>	 <p>Válvula de regulación de conducción de solución nutritiva</p>
 <p>Línea de conducción de la solución nutritiva</p>	 <p>Válvulas reguladoras de solución nutritiva ubicadas en la parte superior del sistema de hidroponía</p>

Anexo 10. Siembra de plantas de lechuga en unidades hidropónicas

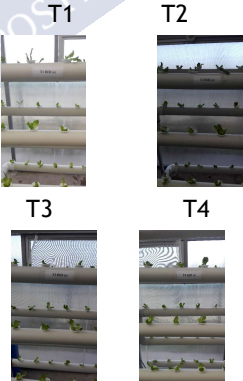
Bloque I



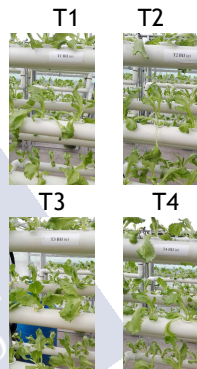
Bloque II



Bloque III



Anexo 11. Desarrollo vegetativo de lechuga hidropónica a los 15 días desde la siembra



Anexo 12. Desarrollo vegetativo de lechuga hidropónica a los 28 días desde la siembra

Bloque I



T1



T2



T3



T4



Bloque II



T1



T2



T3



T4



Bloque III



T1



T2



T3



T4



Anexo 13. Secuencia del crecimiento del cultivo de lechuga

Día 4



Día 6



Día 10



Día 14



Día 18



Día 22



Día 25



Día 28

