

Universidad de Cienfuegos “Carlos Rafael Rodríguez”.

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería Química



Trabajo de Diploma

Título:

Contribución a los estudios de reducción de las emisiones industriales de CO₂ mediante cultivo intensivo de macroalgas marinas como fuente de biomasa.

Autor: Leydis Aldana Moraga

Tutores: Dr. C. Agustín García Rodríguez (UCLV)

Dr. C. Juan Pedro Hernández Touset (UCLV)

Consultante: Ing. Anabel Pulido Caraballe (CEAC)

Cienfuegos,
2014

Hay que trabajar para enriquecer los conocimientos adquiridos durante los estudios, para saberlos aplicar en la práctica de manera creadora y recordar que la realidad es siempre mucho más rica que la teoría, pero que la teoría es imprescindible para desarrollar el trabajo profesional de un mundo científico.

Fidel Castro Ruz



Dedico esta tesis a:
Mi madre Nancy Moraga, mi hermano Reinier
Aldana,
por el apoyo incondicional que me brindaron
durante toda la vida
y por todos los sacrificios.
A mi padre Mario Aldana Fonseca, que ya no
está, y siempre soñó compartir este momento
conmigo.
A mi querida hermana Katia Pellicer Moraga.
A todos los amo.



Dedicatoria

*Quiero darles las gracias a mi mamá y a mi hermano
por apoyarme siempre, confiar en mí, y por su ayuda
incondicional.*

*Mi novio Iván O. Arística Bernia y a su familia,
especialmente a su abuela*

*Alicia Giménez por su preocupación apoyo y
dedicación en estos tres últimos años de mi vida.*

*A mis compañeros de grupo por compartir cinco años
conmigo, especialmente Daineris, Gretchen y Lisnaicy
por estar presente siempre que las necesité.*

*Los profesores que se esforzaron muchísimo para ser
de nosotros buenos profesionales.*

*Mis tutores Dr. C. Agustín García Rodríguez y
Dr. C. Juan P. Hernández Touset, por ser mis guías en
esta última travesía.*

*A los trabajadores del Centro de Estudios Ambientales
de Cienfuegos que me ayudaron a realizar este trabajo,
y a los que se preocuparon.*

A todos los que me quieren.

Gracias.

Agradecimientos



Resumen

Mediante el cultivo intensivo de las macroalgas se puede contribuir a reducir los niveles de contaminación ambiental por emisión de CO_2 generado por las industrias de Cienfuegos que utilizan combustibles fósiles. El presente trabajo se lleva a cabo con el objetivo de evaluar el cultivo intensivo de la macroalga marina *Ulva Lactuca* utilizando el CO_2 como nutriente el cual contribuye al crecimiento acelerado de las algas, las cuales aportan grandes cantidades de biomasa que se utilizan en la producción de productos farmacéuticos, cosméticos, alimento animal, fertilizantes, biocombustibles, etc. El estudio se realiza a escala de laboratorio con agua de mar natural y la incorporación de nutrientes, aire atmosférico y CO_2 . Para el sistema de biorreacción se propone un biorreactor rectangular con agitación y operación continua, teniendo en cuenta como parámetros fundamentales para el sistema de biorreacción a escala de laboratorio, la incorporación de CO_2 y distribución de aire. Se realiza el análisis de las principales variables físico-químicas a tener en cuenta en este tipo de proceso, a partir de la medición por métodos gravimétricos de las concentraciones de los fundamentales nutrientes necesarios para el crecimiento de la planta como nitratos, nitritos, fosfatos y oxígeno disuelto, determinando además la generación de biomasa. Se estima de forma preliminar el costo de producción de la biomasa algal y los indicadores dinámicos de rentabilidad de un proyecto de inversión de una planta piloto para el cultivo intensivo de macroalgas a partir de los ingresos por venta de productos de alto valor agregado.

Abstract

With the intensive culture of macroalgae, the levels of environmental contamination for emission of CO₂ generated by the industries of Cienfuegos that use fossil fuels can be reduced. The present work is carried out with the objective of assess the intensive culture of *Ulva Lactuca* seaweeds using the CO₂ as nutrient which contributes to the rapid growth of the algae, those which to contribute with high quantities of biomass in the production of pharmaceutical, cosmetics, animal food, fertilizers and biofuels products. The study is carried out from laboratory scale with natural sea water and with the addition of nutrients, atmospheric air and CO₂. For the biorreaction system a rectangular biorreactor with agitation and continuous operation is proposed, keeping in mind the fundamental parameters for the biorreaction system, like the addition of CO₂, distribution of air and the measurement of necessary nutrient concentrations for the growth of the plants, like nitrates, nitrites, phosphates and dissolved oxygen, also determining biomass generation. A preliminary estimation of total manufacturing cost of and dynamic indicators of profitability of a pilot plant project for the intensive culture of macroalgae is made, starting from the revenues from the sale of high added value products.

Tabla de contenido

Introducción	1
Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.....	4
1.1 Biodiversidad de las algas.....	4
1.2 Utilidad de las macroalgas como purificador natural del medio ambiente.....	5
1.3 Características de la <i>Ulva Lactuca</i>	8
1.4 Factores que limitan la producción masiva de las algas.....	10
1.4.1 Luz y temperatura.....	11
1.4.2 Salinidad	11
1.4.3 pH.....	12
1.4.4 CO ₂	13
1.4.5 Nitrógeno y Fósforo	14
1.5 Diseño conceptual de sistemas de biorreacción.....	15
1.6 Sistemas intensivos de cultivo.....	19
1.7 Tecnología y equipamiento.....	21
1.7.1 Estación para estudios experimentales.....	24
1.8. Incorporación y medición de CO ₂ en un sistema de cultivo.....	25
Conclusiones parciales.....	27
Capítulo II. Evaluación del sistema experimental para el cultivo intensivo de la macroalga marina <i>Ulva Lactuca</i>	28
2.1 Sistema experimental para el cultivo intensivo de la macroalga <i>Ulva lactuca</i>	28
2.2 Descripción del proceso.....	28
2.3 Preparación de la muestra para el cultivo.....	29
2.4 Diseño y montaje para del sistema experimental a escala de Laboratorio.....	29
2.5 Determinación del flujo de agua de entrada y salida del biorreactor.....	31
2.6 Determinación del flujo de Aire y CO ₂	31
2.7 Determinación del peso inicial y final.....	32
2.8 Determinación de biomasa seca de la <i>Ulva lactuca</i>	32
2.9 Determinación de la cinética de reacción considerando una reacción de primer orden sobre la base de biomasa generada.....	33
2.10 Balance de masa de P-PO ₄ ³⁻ , N-NO ₃ ⁻ , N-NO ₂ ⁻ en el agua de mar.....	37
2.11 Comparación de la eficiencia del desarrollo del cultivo intensivo de las algas.....	38
Conclusiones parciales	41

<i>Capítulo III. Propuesta de un sistema experimental piloto para el cultivo de macroalgas marinas con uso de Dióxido de Carbono como nutriente.</i>	42
3.1 <i>Determinación de los defectos de flujo del biorreactor experimental. Propuesta del modelo de reacción.</i>	42
3.1.1 <i>Análisis preliminar de la aplicación del modelo de flujo.</i>	44
3.2 <i>Propuesta de un biorreactor para la producción de 1 kg/d de biomasa seca a escala piloto.</i>	45
3.3 <i>Propuesta preliminar de estación experimental piloto.</i>	48
3.4 <i>Evaluación económica preliminar.</i>	49
3.4.1 <i>Estimación del costo de inversión.</i>	49
3.4.2 <i>Estimación del costo de producción.</i>	51
3.4.3 <i>Análisis de rentabilidad.</i>	53
<i>Conclusiones parciales</i>	55
<i>Conclusiones</i>	56
<i>Recomendaciones</i>	57
<i>Anexos</i>	63

Introducción

La creciente contaminación ambiental y el cambio climático es uno de los principales problemas que afectan el planeta, consecuencia de la emisión de gases que potencian el efecto invernadero (GEI). El dióxido de carbono es, entre todos los gases el que más influye en el denominado efecto invernadero de la atmósfera, que genera el incremento incesante de la temperatura ambiental del planeta y sus catastróficas consecuencias para la vida en la Tierra.

La quema de combustibles para energía en fuentes estacionarias y móviles (transporte terrestre, avión, etc.), emisiones de las actividades del petróleo y gas natural, la explotación de la industria química, la producción y consumo de hidrocarburos, el incremento de la pérdida de biomasa en bosques producto de los incendios, entre otras, son las principales actividades desarrolladas por el hombre que generan emisiones de CO₂ a la atmósfera, provocando así el incremento del efecto invernadero. La única defensa razonable ante el cambio climático es la reducción drástica de emisiones de dióxido de carbono. La posibilidad de aprovechar de forma más beneficiosa y evitar los efectos negativos de este contaminante es utilizarlo como materia de otros productos que impidan su expulsión a la atmósfera.

Las algas pueden alimentarse de las emisiones de CO₂ procedentes de las actividades desarrolladas por el hombre, estas tienen la capacidad de fijación del CO₂ a través de la fotosíntesis, reduciendo así las emisiones de CO₂, a la vez que producen una valiosa biomasa fuente de numerosos productos beneficiosos para el hombre tanto en la alimentación humana como animal, en la farmacología, la cosmética y la producción de biocombustibles renovables, entre otros, Por este motivo, el cultivo de algas y en especial el intensivo es una vía que está siendo estudiada prioritariamente en la actualidad en todo el mundo.

Las plantas químicas existentes en la provincia de Cienfuegos emiten una apreciable cantidad de dióxido de carbono, que contamina de forma significativa el medio ambiente. Las algas utilizan el CO₂ en su metabolismo, contribuyendo con la regulación del ecosistema, por lo que actualmente se desarrolla un proyecto de investigaciones en esta región con vistas a mitigar la contaminación por el CO₂ residual industrial que se emite, a

través del desarrollo de instalaciones de biorreactores para el cultivo intensivo de la macroalga *Ulva lactuca*, una fuente natural autóctona en la bahía de Cienfuegos.

Problema científico

No existen instalaciones experimentales en el país para el desarrollo de estudios y el escalado de biorreactores para el cultivo intensivo de macroalgas marinas, que permitan realizar estudios fundamentales para el desarrollo de una planta piloto demostrativa para determinar la factibilidad técnico, económica y ambiental de inversiones industriales con el fin de aprovechar el CO₂ residual industrial y consecuentemente mitigar la contaminación atmosférica.

Hipótesis:

Es posible obtener informaciones sobre las condiciones de cultivo de la macroalga marina *Ulva lactuca*, influencia de los nutrientes y parámetros de diseño del biorreactor, mediante el desarrollo de una estación de cultivo intensivo de macroalgas marinas a niveles de laboratorio que permita sentar bases para el desarrollo de una tecnología de cultivo intensivo de esta especie con el propósito de disminuir las concentraciones de CO₂ en el aire y producir cantidades apreciables de biomasa algal como fuente de productos químicos, bioquímicos y alimenticios.

Objetivo general:

Evaluar en una instalación experimental a nivel de laboratorio el cultivo intensivo de la macroalga marina *Ulva lactuca* utilizando el CO₂ como nutriente adicional a los comúnmente empleados.

Objetivos específicos:

1. Realizar análisis bibliográfico sobre el cultivo intensivo de macroalgas marinas y la influencia de diferentes variables como nutrientes, iluminación, tecnologías de cultivo y equipamientos.

2. Perfeccionar y operar un sistema de biorreacción continuo a escala de laboratorio para el cultivo intensivo de macroalgas marinas, que permita incluir CO_2 como nutriente adicional.
3. Evaluar el sistema de biorreacción según los parámetros de control operacional en el proceso, fuentes de sustrato y nutrientes, dispositivo de distribución de aire y CO_2 , así como los defectos de flujo en el biorreactor.
4. Realizar la propuesta preliminar de diseño de una planta piloto a partir de la información obtenida en el estudio experimental.

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

1.1 Biodiversidad de las algas.

Las algas poseen una diversidad mayor que muchos grupos de plantas terrestres o de grupos de animales. Sin embargo, el papel que desempeñan en el mantenimiento y funcionamiento global de los ecosistemas se subestima y a veces hasta es sujeto de polémicas. Hasta hace algunos años se pensaba que de todas las especies de animales y plantas descritas en el mundo únicamente 15% habitaban en el océano, pero algunos estudios recientes indican que los océanos albergan casi el doble de taxa que los que existen en el medio terrestre.

Se cree que la edad geológica de las algas verde azules es poco más o menos 3 550 millones de años, a diferencia de los 400 millones de años que tienen las plantas terrestres. Además de que conviene recordar que fue el oxígeno generado por la fotosíntesis de las algas verde azules, y posteriormente por las algas eucariotas, más desarrolladas, el que formó nuestra atmósfera. Actualmente, las algas realizan cerca de 50% de la fotosíntesis del planeta, lo que las ubica en una posición crucial para el mantenimiento de la vida en la Tierra. Este grupo tan heterogéneo de organismos se divide a su vez en más de una docena de grupos, división basada principalmente en su composición pigmentaria, sus materiales de reserva y una gran variedad de detalles estructurales. Su diversidad se cifra no sólo en su forma de crecimiento o de alimentación y en su dependencia o no de la luz solar, sino hasta en sus diferencias estructurales, ya que existen tanto algas microscópicas unicelulares, como algas filamentosas o laminares, además de complejas estructuras multicelulares como las de las algas pardas, que pueden llegar a medir más de 20 metros de longitud.

La diversidad de las algas también está dada por su bioquímica y fisiología, además por la organización de su material genético que se refleja tanto en las algas verde azules, llamadas procariotas, que son más simples y están relacionadas con las bacterias, como en el resto de las especies de algas, llamadas eucariotas. Esta diversidad genética y fenotípica se manifiesta más claramente en su diversidad ecológica, que es la que determina su distribución en la biosfera. Por otra parte, conviene señalar que los tan apreciados arrecifes coralinos están compuestos por una gran cantidad de algas hasta tres cuartas partes del tejido de un coral vivo son algas, y que mucha de la productividad primaria generada por

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

estos corales se debe a las algas, mientras que en las regiones costeras las macroalgas son un componente ecológico vital para el desarrollo de comunidades de invertebrados al servirles de refugio y alimento, y cuya repercusión se observa en las pesquerías de otros organismos marinos como peces y moluscos. Las 36 000 especies de algas conocidas apenas representan 17% de las especies que existen actualmente, lo que indica que el número total de especies de algas que existen en el mundo debe superar las 200 000. (Robledo, 2012)

Se considera que hay unas 15 800 especies de macroalgas repartidas entre: macroalgas rojas (6 000 especies), pardas (1 800), verdes (8 000 especies, de las cuales 1 000 son especies marinas y el resto de agua dulce). (Colectivo de autores, 2010).

1.2 Utilidad de las macroalgas como purificador natural del medio ambiente.

La creciente preocupación por la salud y el medio ambiente, junto a la influencia que sobre ambos ejercen los gases nocivos producidos por el hombre obliga a una gestión lo más adecuada posible de los mismos para reducir sus efectos negativos.

Una de las posibles soluciones para contribuir a la mitigación de la contaminación ambiental en el sistema ecológico es a partir del cultivo de algas marinas en estaciones diseñadas para el cultivo intensivo en zonas aledañas a la instalación que se beneficiaría por el aprovechamiento principalmente CO₂ que se generan en esa industria. Siendo una de sus opciones la obtención de productos naturales como biocombustibles, productos de alto valor agregado, alimento humano y animal y otros a partir de algas marinas.

Los resultados de los estudios, que se describen más adelante, proveen una visión de qué futuro podrían tener las macroalgas marinas, debido al continuo incremento de la concentración de CO₂ en la atmósfera. (Gao, 1993) cultivó la macroalga roja *Gracilaria* sp. y *G. chilensis* en vasijas enriquecidas con nitrógeno y fósforo que fueron continuamente aireadas con aire normal, conteniendo 350 ppm CO₂, aire enriquecido con 650 ppm de CO₂, aire enriquecido con 1250 ppm CO₂, por un periodo de 19 días. Comparado al tratamiento control, el incremento relativo en el crecimiento en los tratamientos +650-ppm y 1250-ppm fueron de 20 y 60% respectivamente para *G. chilensis*, y 130 y 190% respectivamente, para *Gracilaria* sp.

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

Con respecto a estos hallazgos, los investigadores comentan que: “En sus hábitats naturales, la fotosíntesis y el crecimiento de las especies de *Gracilaria* están probablemente limitadas por el CO₂, especialmente cuando la densidad poblacional es alta y el movimiento del agua es bajo”. Por lo tanto, como el contenido del CO₂ continúa incrementándose, las algas marinas podrían crecer mejor en los próximos años. Este podría repetirse en otras macroalgas, Gao. observó que la fotosíntesis en la mayoría de las macroalgas, esta probablemente limitada por las fuentes de carbono inorgánico en las aguas marinas, citando los estudios de (Surif y Raven 1989), (Marbely 1990), (Gao 1991) y (Levvasseur 1991) como evidencia de esta situación.

En un estudio posterior, (Kluber 1999) cultivo *Lomentaria articulata*, una alga roja común en la zona intertidal del noreste del Atlántico, por tres semanas en cultivo hidropónicos sujetos a varias concentraciones de CO₂ y O₂. Ellos encontraron que las concentraciones de oxígeno en un rango de 10 a 200% del ambiente, no tuvo efectos significativos en la ganancia diaria neta de carbono en las algas o en la tasa de producción del total de la biomasa húmeda. En contraste, las concentraciones de CO₂ de 67 a 500% del ambiente, tuvieron efectos altamente significativos en estos parámetros. Por ejemplo, para una concentración de CO₂ del doble que existe en el ambiente, la ganancia diaria neta de carbono y la producción total de biomasa húmeda fue 52 y 315% mayor que cuando las algas fueron cultivadas a las concentraciones ambientales de CO₂.

Recientemente, (Zou 2005) colectó especímenes del alga marrón *Hizikia fusiforme* de las rocas intertidales a lo largo de la costa de la Isla Nanao, Shantou, China, y los mantuvo en acuario de vidrio que contenía agua de mar filtrada con 60uM NaNO₃ y 6.0 uM NaH₂PO₄, mientras que se aireaba continuamente los acuarios, con aire que contenía concentraciones de CO₂ de 360 a 700 ppm, y periódicamente midieron el crecimiento de las algas y las tasas de asimilación de nitrógeno, así como las actividades de reducción del nitrato. Por estos medios, ellos determinaron que un incremento de al menos el doble de la concentración de CO₂ en el aire incrementa la tasa promedio de crecimiento relativo del alga en 50%, y la tasa promedio de asimilación de nitrato durante los periodos de 12 horas luz del estudio en más de 200%, y su actividad de reducción del nitrato en aproximadamente 20% para todas las concentraciones de nitratos.

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

Como un aspecto subsidiario del estudio, Zou destaco que el extracto de *H. fusiforme* tiene una actividad inmunológica en humanos y su capacidad puede ser usada en aplicaciones clínicas para tratar varias enfermedades como los tumores (Suetsuna, 1998; & Shan 1999). Él también reporto que el alga viene siendo usada como alimento e ingrediente en China, Japón y Corea. De hecho, él indica que esta alga es una de las más importantes especies en la maricultura de algas en China, debido a su valor comercial y al incremento de la demanda en el mercado. Como resultado, el incremento en el contenido de CO₂ en el aire favorecerá esta actividad. Adicionalmente, Zou nota que el cultivo intensivo de *H. fusiforme* podría remover los nutrientes más eficientemente con la futura elevación de los niveles de CO₂ en el agua de mar, el cual puede ser una posible solución al problema de la eutrofización de la costa, sugiriendo que el incremento de los niveles de CO₂ puede también ayudar en la mitigación de este problema ambiental.

A la luz de estas observaciones, hay razones para creer que el incremento del contenido de CO₂ en el aire podría ayudar a las macroalgas marinas a ser más productivas con el paso del tiempo o a intensificar su cultivo creando condiciones favorables de incremento del CO₂ en la estación de cultivo.

En cuanto al uso de la macroalgas para la producción de combustible, la empresa Israelí Seambiotic Ltd. ha patentado una técnica en la cual produce un litro de combustible por cada 5 kg de una especie de macroalga proveniente del mar Mediterráneo.

Aun cuando, la producción de biocombustibles se presentan como “amigables” al ambiente, han surgido una serie de cuestionamientos debido a que se están afectando los bosques naturales para ampliar los terrenos cultivables, se está reemplazando el cultivo de productos alimenticios, se incrementara el uso de fertilizantes y pesticidas; además de la quema de algunas cosechas (caña) para la obtención del azúcar, lo que contribuye con los gases invernaderos.

Actualmente, existe una serie de cuestionamientos a los biocombustibles obtenidos de plantas terrestres. No obstante, esto se constituye en una gran oportunidad para los biocombustibles obtenidos desde las algas (macro y microalgas).

Las investigaciones para la obtención de biocombustibles desde las algas no son nuevas; no obstante, recién en los últimos años se le está prestando la debida atención. Según (Gao, & McKinley 1993) las macroalgas tienen una mayor productividad que las plantas terrestres,

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

y no compiten con ellas por el terreno; además debemos considerar que las algas se pueden cultivar en zonas marinas o en tierra obteniéndose varias cosechas al año, por tanto se puede afirmar que prometen ser la alternativa ambiental y económicamente más factibles que las otras para la sustitución de los combustibles fósiles. (Reith 2005).

Por otro lado, las algas tienen un bajo contenido de celulosa, lo que los convierte en un material adecuado para la degradación biológica (Horn 2000). Asimismo, las algas producen naturalmente aceite; alternativamente otras especies de algas que producen más carbohidratos y menos aceite, pueden ser procesados y fermentados para producir etanol. Todo lo cual justifica la producción de biocombustibles obtenidos de las algas y de las oportunidades que están tecnologías ofrecen para los cultivadores de macro y microalgas. (Briggs 2004). Dentro de la producción de biocombustibles, el biodiesel, es un éster metílico generado a partir de un aceite vegetal, algas o animal. No es contaminante ya que aunque su combustión produce CO₂ que va a pasar a la atmósfera, el mismo formara parte del ciclo de CO₂ que las plantas o las algas de las que proviene absorbieron durante su crecimiento, por lo tanto se libera a la atmósfera prácticamente la misma cantidad de CO₂ que se consumió. Es biodegradable, no es tóxico, y típicamente produce cerca de 60 % menos emisiones de dióxido de carbono.

(Isaac Berzin) citado por (Clayton 2006) ha demostrado experimentalmente la factibilidad de absorber CO₂ con hileras de gruesas tuberías limpias, cada una de las cuales contiene algas verdes cocinándose a fuego lento con emisiones cargadas de CO₂ procedentes de chimeneas de una central eléctrica, donde las burbujas limpiadoras de chimeneas apuntan hacia el cielo, solo que las emisiones de CO₂ se reducen en un porcentaje del 40% (mucho más que lo que exige el tratado de Kyoto). Después de absorber el CO₂ como una esponja, las algas se recolectan cada día. A partir de esa cosecha se obtiene, tras prensar las algas, un combustible vegetal: biodiesel para automóviles. Incluso esos restos resacos pueden ser de nuevo reprocesados para crear etanol, empleado también en transporte.

1.3 Características de la *Ulva Lactuca*.

La *Ulva Lactuca*, conocida comúnmente como lamilla, es un alga verde incluida entre las lechugas de mar, crece en la zona intermareal de la mayoría de los océanos del mundo, en

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

charcas, rocas o sublitoral hasta 20 m. Al tolerar salinidades bajas puede encontrarse en estuarios, y también frecuentemente en zonas donde existen aportes nitrogenados.

Esta es de talo verde laminar, foliáceo, lobulado, formado por dos capas de células, fijado al sustrato por rizoides que crecen como expansiones de las células basales del talo. Puede llegar a medir 1 m de longitud, de contorno más o menos redondeado, a veces dividido. Sus largas hojas le dan un aspecto similar al de la lechuga. En la zona basal puede presentar unas costillas más oscuras debido al agrupamiento de rizoides color verde claro u oscuro. Para una correcta determinación es necesario su observación al microscopio; en este se puede observar como sus células se disponen en líneas ligeramente curvas, todas con un pirenoide generalmente, y que las células más superiores que emiten rizoides son del mismo tamaño que las que no los emiten.

Especie dioica cuyos talos productores de gametos masculinos (gametófitos masculinos) se distinguen de los productores de gametos femeninos (gametófitos femeninos) por la tonalidad de los márgenes de la lámina: verde amarillento en los primeros y verde oscuro en los segundos.

Esta es un alga comestible, que contiene vitamina C y vitamina A. En cosmética se utiliza en la elaboración de productos por sus propiedades hidratantes y diversas poblaciones costeras le dan uso agrícola como fertilizante. (Colectivo de autores, 2013)

Poseen un alto contenido de fibra dietética, especialmente de fibra soluble. Aunque la mayor fuente de polisacáridos es obtenida a partir de las macroalgas rojas y pardas, también existen polisacáridos sulfatados que forman la pared celular en las algas verdes *U. fasciata* y *U. lactuca* poseen cantidades considerables de este componente, el cual varía de acuerdo al lugar y época del año. En *U. lactuca* se ha comprobado la presencia de glucosa, xylosa, glucitol y un trisacárido.

Se ha comprobado que la reproducción en *Ulva* sigue un ciclo lunar con emisión de los elementos reproductores en los períodos de luna llena o cambios de luna. El período reproductivo de estas macroalgas es de marzo a julio, cuando se acercan grandes mareas. Con buenas condiciones ambientales los talos jóvenes crecen entre 3 mm y 5 mm en menos de un mes y se tornan adultas entre 3 y 4 meses. Su ciclo de vida es corto, se estima que dura entre 5 y 8 meses. Los talos maduran en algunas semanas en ambientes de salinidades bajas y temperaturas altas.

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

Estos organismos marinos mantienen una elevada tasa de crecimiento cuando la disponibilidad de nutrientes es alta.

En las costas cubanas es común observar *U. Fasciata* y *U. lactuca*. Estos vegetales marinos alcanzan aproximadamente 15 cm de altura cuando están adheridas al sustrato, rocas u otros objetos sólidos en fondos arenosos de aguas someras. En lugares tranquilos se han encontrado talos de hasta 1 m de altura y 30 cm o 50 cm de ancho. Ambas especies pueden resistir períodos largos de desecación, por lo que están capacitadas para vivir en el mesolitoral. (Cano Mallo, 2008).

Atendiendo el análisis de composición de la *Ulva lactuca*, referido a peso seco (mg/100g), los siguientes son los datos: Nitrógeno (0.95-2.94), fósforo (130.4-202.55), potasio (792.7-2816.2), sodio (674.77-1075.8), calcio (858.0-880.0), magnesio (3582.2-3785.3). Los componentes orgánicos referidos a porcentaje peso seco son: Proteína (5.9-18.38%), fibra (7.6-27.4%), cenizas (25.5-33.4%), carbohidratos (49.2-68.9%), materia orgánica/Demanda Química de Oxígeno DQO (2726.0-3456 mg/L. (Basaure, 2011)

A modo de comentario general (Basaure, 2011) es posible afirmar que esta especie de alga contiene 10 veces más vitamina C que una naranja, 2 veces más de vitamina A que una col, posee un alto porcentaje de hierro, de hecho 10 gramos de esta alga equivalen a 500 gramos de consumo de espinaca, 100 gramos de *Ulva lactuca* corresponden a 2 veces más de hierro si se consumen 100 gramos de lenteja, posee además de yodo, pigmentos como los carotenoides y las xantofilas. Una vez desalinizada, su pH medio corresponde a 6.8. Es una materia orgánica rica en vitamina E, B y B12.

1.4 Factores que limitan la producción masiva de las algas.

La importancia de factores como el diseño del tanque, el bombeo y movimiento, agitación del medio de cultivo, la irradiación, la temperatura, la salinidad, el aporte de nutrientes, la concentración del carbono inorgánico disuelto y su efecto sobre el pH del medio, la densidad (óptima y máxima) y la competición de especies (crecimiento de epifitos sobre las macroalgas, impidiéndoles a estas realizar correctamente la fotosíntesis llegando incluso a morir) muestran un efecto directo sobre el principal proceso fisiológico de las algas, la fotosíntesis, y por lo tanto, sobre los valores máximos de producción y eficiencia del sistema (% conversión de energía luminosa en biomasa). A mayor control de estas

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

variables, mayor posibilidad de incrementar la producción y modificar la calidad de la biomasa obtenida.

Toda la actividad biológica en plantas es en última instancia dependiente en la radiación solar recibida. Todas las plantas requieren luz del sol, el dióxido de carbono, y el agua para la fotosíntesis. La fotosíntesis es también dependiente de la temperatura y los alimentos.

1.4.1 Luz y temperatura

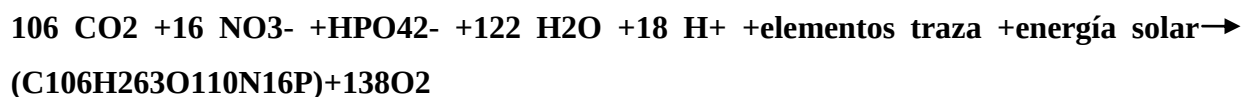
La irradiación y la temperatura son parámetros muy importantes, la luz es de fundamental importancia como fuente de energía para la fotosíntesis. La incidencia sobre las algas depende tanto de su intensidad como de su calidad. Estas varían según la profundidad y la latitud en que se desarrollan, y de acuerdo a la hora del día y a la estación del año.

La temperatura controla el índice del metabolismo de la planta que alternadamente determina la cantidad de fotosíntesis que puede ocurrir. La mayoría de la actividad metabólica biológica en el océano ocurre entre 0 y 27 °C. Hay poca actividad sobre o debajo de este rango. Las temperaturas óptimas para la productividad coinciden con 15 a 20 °C para la fotosíntesis (Edding, Tala, & Vásquez, 2006).

En las algas macroscópicas se dan distintos óptimos de luces. En *Glacilaria conferta* presenta su óptimo de crecimiento por debajo de 1000 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, *Glacilaria secundata*, sin embargo, no ve saturada su crecimiento a 1450 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$. Por otro lado los óptimos térmicos de las algas varían según la especie. (Álvarez Cobelas & Gallardo, 1989)

En consecuencia, cada vez que la luz esté presente, se desencadenará en la planta el proceso descrito.

Según (Betancourt 2006), la ecuación química para describir la fotosíntesis es:



1.4.2 Salinidad

La salinidad es la concentración total de los iones disueltos. La salinidad depende básicamente de siete iones, cuyo valor promedio de concentración en el agua de mar es:

Sodio, 10,500 mg/L;

Magnesio, 1,450 mg/L;

Calcio, 400 mg/L;

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

Potasio, 370 mg/L;

Cloruro, 19,000mg/L;

Sulfato, 2,700 mg/L;

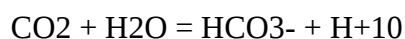
Bicarbonato, 142 mg/L.

La salinidad promedio del agua de mar es 34.5 partes por millón (ppm). Las variaciones en salinidad que se encuentran en el océano son consecuencia del origen de las masas de agua y su proximidad a desembocadura de cursos de aguas continentales. Los resultados de experimentos de cultivo realizados por (Matsuyama-Serizawa 2004) con el alga filamentosa verde *Rhizoclonium* que habita en un amplio rango de salinidades (10-40 ppm), no afectan su crecimiento y maduración. Sólo se observó un bajo de la fotosíntesis en los extremos de 0 y 40 ppm. Las algas submareales soportan exposiciones breves a concentraciones de 15 a 45 partes por millón. (Edding et al., 2006).

1.4.3 pH

El pH indica cuán ácida o básica es el agua. De una manera más práctica, el agua con un pH de 7 se considera neutra. Cuando el pH es inferior a 7 el agua es ácida, y cuando el pH es superior a 7 el agua es básica.

Los estanques de agua salobre generalmente tienen un pH de 7 u 8 por la mañana, pero en la tarde generalmente suben a 8 ó 9. La fluctuación diaria del pH en los estanques resulta de los cambios en la fotosíntesis de las algas y otras plantas acuáticas. El dióxido de carbono es ácido tal como se muestra en la siguiente ecuación:



Si la concentración de dióxido de carbono crece, la de iones de hidrógeno aumenta y el pH disminuye y, al contrario, si disminuye la concentración de dióxido de carbono, la de iones de hidrógeno cae y el pH aumenta. Durante el día las algas consume dióxido de carbono y el pH del agua aumenta. Por la noche, la algas no utiliza el dióxido de carbono, pero todos los organismos del estanque sueltan dióxido de carbono durante la respiración y a medida que se acumula el dióxido de carbono el pH baja.(Boyd, s.f.)

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

Tabla 1.1

Efecto	pH
Punto de acidez letal	4
No reproducción	4-5
Crecimiento lento	4-6
Mejor crecimiento	6-9
Crecimiento lento	9-11
Punto letal de alcalinidad	11

1.4.4 CO₂

Las principales fuente de carbono inorgánico para el cultivo masivo en algas son el dióxido de carbono libre y el bicarbonato. Energéticamente, para las algas resulta más barato el primero puesto que aquel penetra por difusión en la célula, mientras que el bicarbonato lo hace por transporte activo. Por ello, cuando se trata de optimizar la producción parece aconsejable el añadir CO₂.

Generalmente en el cultivo masivo de algas con medio sintético se aporta dióxido de carbono mezclado con aire. (Alvarez Cobelas & Gallardo, 1989)

En un cultivo de algas, entre un 20 y un 50% del CO₂ suministrado es asimilado, mientras que el resto se pierde a la atmósfera. Por esta razón es ridículo pensar en el suministro de CO₂ mediante botellas, ya que de esta manera el balance de emisiones siempre será positivo (a lo que habría que sumar las emisiones derivadas de la producción de CO₂ para embotellar). Por tanto, es imprescindible suministrar al cultivo una fuente de carbono proveniente de focos de emisión ya establecidos, como los que se producen en las centrales térmicas, cementeras y otras actividades industriales. La diferencia entre fijación de CO₂ y secuestro se debe a una escala temporal, ya que mientras la fijación capta el carbono durante el periodo de vida del alga hasta su descomposición, el secuestro trata de almacenar los gases durante un periodo prolongado de tiempo sin que este pase a la atmósfera. (Gómez Hermoso, 2009).

El método más comúnmente empleado consiste en inyectar CO₂ mezclado con aire con tuberías que desembocan en tubos perforados situados en el fondo de estanque de cultivo, pero parece ser que, dependiendo de la perforación de dicho tubos, puede presentarse problemas porque las burbujas pequeñas inducen la flotación de las algas y la reducción,

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

por tanto, de la producción de las grandes con un 1 % de CO₂ en aire producen narcosis en las células. (Alvarez Cobelas & Gallardo, 1989)

(Tisserat 2001), cultivó menta acuática durante cuatro semanas con concentración de 350 ppm y 3000 ppm de CO₂. Las plantas que han sido cultivadas en concentración de CO₂ de 3000 ppm produjeron 220% más de biomasa.

1.4.5 Nitrógeno y Fósforo

Las algas precisan de una serie de nutrientes minerales indispensables para su desarrollo y reproducción como nitrógeno, hierro y fósforo, entre otros.

Los nutrientes presentan diferentes denominaciones de acuerdo a su concentración. Los macronutrientes son aquellos nutrientes que se encuentran en el agua de mar en concentraciones superiores a 0,02 mmol Kg⁻¹. Los micronutrientes se encuentran en concentraciones desde 0,5 x 10⁻⁶ mmol Kg⁻¹.

El nitrógeno y el fósforo son los nutrientes más importantes en los estanques. De su concentración depende el crecimiento óptimo de la planta. Si hay poco fósforo y nitrógeno, habrá muy poco crecimiento, si hay mucho fósforo y nitrógeno existirá exceso de crecimiento, y durante la noche caerá el oxígeno disuelto.

La captación de compuestos nitrogenados puede estar condicionada por su disponibilidad y por factores ambientales del momento. Se ha observado que *Ulva lactuca* Linnaeus y *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss son capaces de captar nitrógeno disuelto en el agua de mar en su forma orgánica de urea. De estas, *U. lactuca* fue la especie capaz de captar más nitrógeno. (Edding et al., 2006)

El fósforo disponible puede regular la utilización del carbono inorgánico de la *Gracilaria lemaneiformis* cultivada a diferentes niveles de CO₂. Un alto contenido de fósforo estimula la utilización de carbono inorgánico fotosintético y captura de nitrógeno. En condiciones de bajo contenido de fósforo, los tallos crecidos en un alto contenido de CO₂ tenían menor capacidad de utilización del carbono y mayor velocidad de captura de nitrógeno, comparado con los que crecían en CO₂ ambiental.

Más importante que el nitrógeno y el fósforo aislados es la relación entre ellos sobre todo si se trabaja con cultivos discontinuos o con tiempos de retención largos. (Alvarez Cobelas & Gallardo, 1989).

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

1.5 Diseño conceptual de sistemas de biorreacción.

El diseño conceptual de un sistema de recipientes para el cultivo de microalgas marinas se basa en el modelo de reactor de mezcla perfecta.

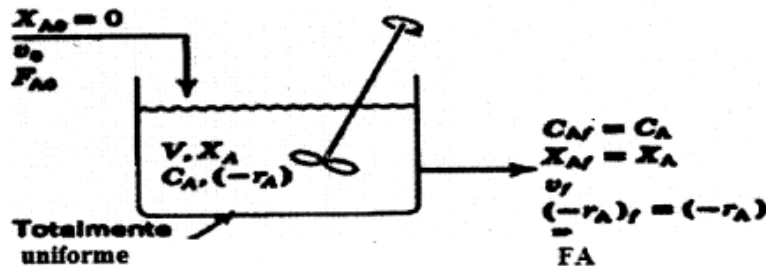


Figura 1.1 Modelo de reactor de mezcla perfecta.

Como se muestra en la Figura 1.1 en un modelo de tanque agitado (RMP) la concentración del reactante limitante, la conversión del mismo y la velocidad de reacción son idénticas dentro del reactor y a la descarga del mismo cuando se alcance comportamiento estacionario del sistema de reacción.

Para cada flujo de operación en dependencia de la concentración del reactante en la alimentación habrá una conversión de equilibrio y por tanto una velocidad de reacción constante en el reactor, relacionada con el tamaño el tanque, que delimitara el tiempo de permanencia del fluido en el reactor.

El modelo ideal obtenido a partir de un balance de materiales en el sistema de reacción será:

$$F_{A0}X_A = (-r_A) \cdot V \quad F_{A0} = C_{A0} \cdot q_0 \quad X_{A0} = 0 \quad \tau = V/q_0$$

Y efectuando operaciones, resulta:

$$V/F_{A0} = \tau / C_{A0} = X_A / -r_A$$

$$\tau = C_{A0} (X_A / -r_A) \quad (\text{Ecuación de diseño de un reactor RMP})$$

Donde F_{A0} es el flujo másico de alimentación A, X_A la conversión de A en el reactor, V el volumen del reactor, q_0 el flujo volumétrico de alimentación, C_{Af} la concentración final de A y τ el tiempo espacial (parámetro de diseño de un reactor RMP).

(Levenspiel 1987) expone que el comportamiento real de los reactores nunca se ajusta exactamente a estas situaciones idealizadas, en muchos casos se aproxima tanto a estas condiciones que podemos admitir este comportamiento ideal sin incurrir en error

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

apreciable, sin embargo, en otros casos las desviaciones pueden ser muy grandes y originarse por formación de canalizaciones del flujo, por recirculación del fluido, o por formación de zonas estancadas o muertas en el reactor. En todos los elementos del equipo del proceso, tales como intercambiadores de calor, columnas de relleno y reactores deben evitarse esas desviaciones, que siempre originan una disminución en la eficacia de la instalación.

Los problemas del flujo no ideal están íntimamente relacionados con los de cambio de escala, ya que la decisión de si ha de ensayarse o no en planta piloto depende, en gran parte, del control sobre las variables más importantes del proceso. A menudo, el factor no controlable en el cambio de escala es la magnitud de la no idealidad del flujo, y con frecuencia, este factor difiere ampliamente entre las unidades grandes y las pequeñas; por consiguiente, el desconocimiento de este factor puede conducir a grandes errores en el diseño.

Como se está obligado a prescindir de un conocimiento completo sobre el flujo, se debe ser menos ambicioso y observar lo mínimo que se ha de conocer sobre el flujo, que permita disponer de información suficiente para el diseño.

En realidad, en muchos casos no se necesita conocer muchas cosas; simplemente cuanto tiempo permanece cada una de las moléculas en el recipiente, o más exactamente la distribución de tiempos de residencia de la corriente del fluido. Esta información puede determinarse de manera fácil y directa por un método de investigación empleado ampliamente: el método experimental estímulo-respuesta.

En este tipo de experimentación estimulamos al sistema mediante una perturbación y vemos cómo responde a este estímulo; el análisis de la respuesta nos da información sobre el sistema. Este método de experimentación se emplea ampliamente en la investigación científica.

En la experimentación del defecto de flujo en el caso de los reactores de tanque agitado es conveniente utilizar el estímulo escalón. El fundamento de este procedimiento se describe a continuación.

Cuando la corriente de fluido que entra al reactor no contiene trazador alguno, y se le impone una señal trazadora en escalón, (es decir, se sustituye el fluido de reacción totalmente por otro fluido que hace la función de trazador la concentración CO en la

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

corriente de fluido que entra al reactor, se incrementa paulatinamente hasta que alcanza su concentración máxima, se obtiene la denominada Curva F representativa de la concentración del trazador a la salida del recipiente (midiendo esta concentración a la salida en función de su concentración a la entrada, C/C_0) frente al tiempo. En la Figura 1.2 se representa este comportamiento y se observa que es siempre ascendente desde 0 hasta 1.

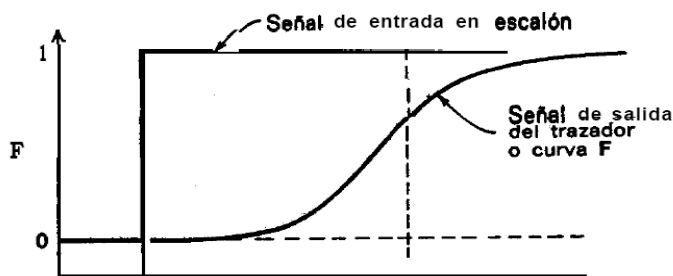


Figura 1.2 Curva F

Modelos de un solo parámetro son aquellos que pueden ser representados por una sola variable y generalmente corresponden a los reactores tubulares cuyo comportamiento se aleja ligeramente del comportamiento del modelo ideal de flujo pistón. Esto no sucede con los reactores de tanque agitado cuyo comportamiento ideal de mezcla perfecta impone defectos de flujo más complejos. Teniendo en cuenta el tipo de biorreactor empleado en este trabajo es de esperar un comportamiento que responda un modelo combinado.

Cuando los modelos de un solo parámetro no representan satisfactoriamente las desviaciones del flujo ideal en pistón o en mezcla completa, hemos de ensayar modelos más complicados. En estos modelos se supone que el reactor real está constituido por una serie de regiones (de flujo en pistón, de flujo disperso en pistón, de flujo en mezcla completa, de aguas muertas) interconectadas entre sí de distintas formas (flujo en desvío, flujo con recirculación o flujo cruzado).

El término aguas muertas se refiere a la porción de fluido contenida en el recipiente con un movimiento relativo lento, y que a veces, como idealización, se supone que está completamente estancado.

En la Fig. 1.3 se representan los tipos sencillos de estos modelos, y puede observarse que las curvas son diferentes y se distinguen unas de otras. Esta propiedad sugiere un método para caracterizar flujos desconocidos, y de hecho se emplea para diagnosticar flujos anómalos en los recipientes, como veremos más adelante.

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

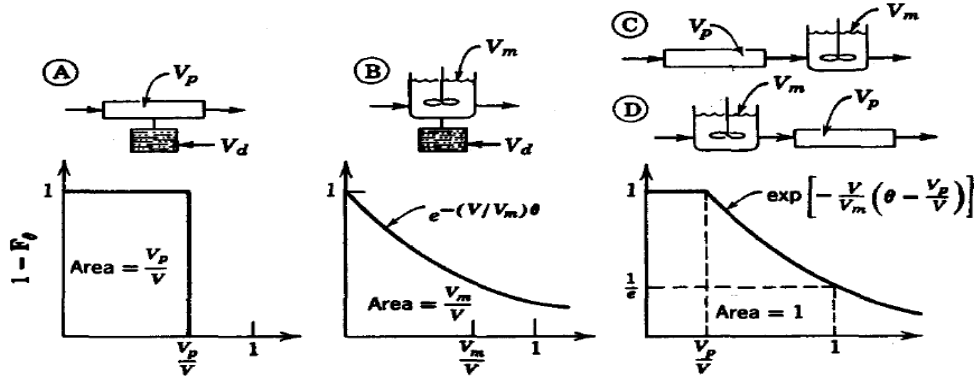


Figura 1.3 Modelos de flujo combinado que caracterizan a los reactores tubulares y de tanque agitado.

Un cultivo batch (discontinuo) constituye una estrategia en la cual los microorganismos se inoculan en medio fresco al inicio del experimento y se dejan crecer por un tiempo determinado, sin adicionar algún otro componente al cultivo. Este tipo de cultivo se caracteriza por presentar cuatro etapas de crecimiento, mostradas en la figura 1.4 y explicadas a continuación, según describe (Lourenco, 2006).

La tasa de crecimiento μ representa el crecimiento por unidad de biomasa (expresada en función de la densidad óptica en este experimento). Para determinarla, normalizar los valores de absorbancia y representarlos en escala logarítmica frente al tiempo en horas. La tasa de crecimiento viene dada por pendiente de la fase logarítmica de crecimiento.

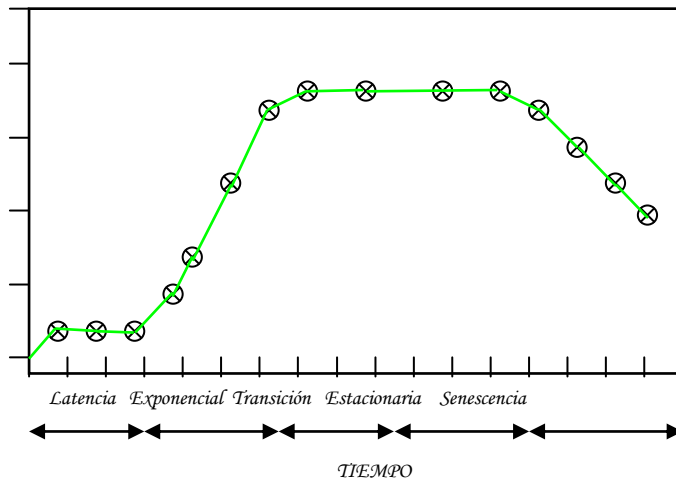


Figura 1.4 Curva de crecimiento de microorganismos (línea sólida) y de consumo de nutrientes (línea a rayas) de un cultivo batch. (1) Fase lag; (2) Fase de crecimiento exponencial; (3) Fase estacionaria; (4) Fase de senescencia. Adaptado de (Mata et al. 2010).

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

Para lograr una técnica apropiada, en la aplicación de cultivos batch se debe tener en cuenta la mezcla continua de la totalidad del medio de cultivo para asegurar una distribución homogénea de la población, así como para facilitar la asimilación del alimento disponible, lograr una buena oxigenación que permita mantener el cultivo a altas densidades y la posibilidad de un aumento de la escala, que no provoque grandes cambios en el diseño de los tanques ni en los principios de cultivo.

1.6 Sistemas intensivos de cultivo.

Los métodos de cultivo de macroalgas marinas son extensivos (mar abierto) e intensivos (en tierra).

En función del aporte del agua de mar a la unidad de cultivo, se distinguen dos tipos fundamentales de sistemas: el tipo abierto, que se caracteriza por la renovación constante del agua, y el tipo semi-cerrado, que precisa de un recambio periódico de agua, aprovechando dichos cambios para el enriquecimiento del medio. (Robledo Ramírez, 1993). En mar abierto el cultivo de macroalgas tiene una estacionalidad y un tiempo de cosecha similar al de un cultivo terrestre. En general son especies de crecimiento muy rápido con un tiempo de cosecha de 4 a 5 meses.

La producción de los sistemas intensivos depende en gran medida de la cantidad de energía invertida. Las mayores producciones en sistemas intensivos, se han obtenido en tanques con agitación vigorosa y altas tasas de renovación de agua de mar enriquecida (Lapointe & Ryther, 1978) citado por (Robledo Ramírez, 1993). No obstante, parte de la eficiencia de los sistemas intensivos bajo condiciones ambientales se basa en los aspectos técnicos de diseño y operación (Bidwellet al. 1985) citado por (Robledo Ramírez, 1993), además de la elección de especies que por sus características biológicas se adapten mejor a los sistemas y que por su importancia económica hagan rentable su producción.

Entre los sistemas de cultivo en tierra, el cultivo por aspersión de macroalgas es el más peculiar. El cultivo intensivo en este sistema, ha sido experimentado en la mayoría de los casos con especies de algas pardas, principalmente *Ascophyllum nodosum*, con la que se han descrito altas producciones.

En general, son pocos los grupos de investigación que han desarrollado trabajos con el sistema por aspersión, y siempre en latitudes altas, donde la temperatura e irradiación

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

condicionan el crecimiento. No obstante, la ausencia de estudios utilizando este sistema en latitudes subtropicales, y empleando especies subtropicales de interés comercial no han permitido comprobar la potencialidad real del cultivo por aspersión.

Las ventajas del cultivo por aspersión son varias, ya que:

- No existe riesgo de limitación por carbono inorgánico, pues la proporción área/superficie del agua incrementa la difusión de dióxido de carbono del aire.
- Se aprovecha mejor la irradiación solar, al recibir la luz de forma directa y reflejada facilitando su acceso con un diseño apropiado del sistema.
- El goteo rompe la capa limitante de difusión, favoreciendo el intercambio de gases y nutrientes.
- Es posible utilizar periodos de desecación, simulando mareas, que evitan la proliferación de epifitos.

En el sistema por aspersión, la reducción de la capa limitante de difusión entre el alga y el medio favorece el intercambio de gases y nutrientes, aunque es de esperar que la asimilación de otros elementos del agua de mar, como metales pesados, también se vea favorecida.

El cultivo en tanque es el sistema más comúnmente utilizado para la producción de macroalgas en tierra. Con el cultivo en tanque de *Chondrus crispus*, se ha demostrado que uno de los factores técnicos más importantes para el crecimiento algal, es la superficie del tanque y no su volumen, debido principalmente a la absorción de la luz por la columna de agua. Además los sistemas de cultivo en tanque requieren mayor gasto de energía para producir la agitación y facilitar el intercambio de gases, la distribución de nutrientes y el movimiento de las algas dentro del tanque. Con la agitación se pretende conseguir un efecto hidrodinámico que:

- Evite fenómenos de auto sombreado, aumentando el tiempo de exposición a la luz, produciendo periodos de luz/oscuridad.
- Elimine la capa limitante de difusión, para favorecer el intercambio de gases y nutrientes.
- Homogenice el medio, eliminando gradientes de pH, temperatura y concentración de nutrientes.

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

- Genere autoraspado, dificultando la fijación de epifitos tanto sobre el talo del alga como sobre las paredes del tanque.

La adaptabilidad morfológica, es un factor que influye de manera directa en el sistema de cultivo a utilizar y en la densidad de carga de cada sistema, condicionando tanto la tasa de crecimiento como la producción. Una morfología adecuada permite aumentar las densidades de carga sin disminuir significativamente la tasa de crecimiento, lo que permite una mayor producción por unidad de superficie si se mantienen niveles de radiación y nutrientes adecuados.

El crecimiento que se produce en los sistemas de cultivo en tanque, como respuesta a la hidrodinamicidad y a la irradiación, provocan en algunos casos una pérdida de orientación del talo con respecto a la luz y al sustrato, generando ramificaciones en diversos sentidos hasta formar morfologías esféricas. Este patrón de crecimiento se ve ampliamente favorecido si la planta se mantiene en suspensión siguiendo un movimiento rotacional dentro del tanque.

Los procesos de selección convencional aplicados a especies cultivadas en tanque, han permitido identificar individuos de alto crecimiento, con características fisiológicas y morfológicas particulares, y que puedan soportar gran variedad de condiciones de cultivo, estrés y patógenos. El clon T4 de *Chondrus crispus* y el clon M-11 de *Gigartina exasperata* son los casos más conocidos de selección vegetativa de clones altamente eficaces para cultivo en tanque.

En los sistemas de cultivo intensivos, la elección de la especie a cultivar es sin duda el aspecto biológico más importante, ya que sus características morfológicas y fisiológicas, así como su capacidad de adaptación a las condiciones de cultivo, determinarán los demás factores de crecimiento y producción. (Robledo Ramírez, 1993).

1.7 Tecnología y equipamiento

Un sistema alternativo para el crecimiento de algas es mediante invernaderos, también en estanque. Aunque se reduce el área de cultivo se solucionan muchos problemas que poseen los sistemas abiertos: menor probabilidad de contaminación por especies no deseadas, pueden cultivarse un mayor número de especies, el periodo de cultivo es mayor ya que hay

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

control de la temperatura y puede incrementarse la cantidad de CO₂ en el ambiente, con lo que también aumentaría la tasa de crecimiento de las algas.

Este presenta una serie de características diferenciales respecto a los otros sistemas bandejas de malla plástica donde se colocan las algas. El sistema puede tener varias de estas bandejas a distintos niveles dependiendo de la altura de la estructura. El suministro de agua a las algas se realiza mediante un flujo, que en forma de ducha, riega el nivel superior y análogamente a una cascada sigue regando el resto de los niveles de la estructura.

En el cultivo por aspersión la estructura de soporte puede albergar varias bandejas cuya anchura, distancia entre ellas y diámetro de la malla, influyen directamente sobre la cantidad de luz que llega a las plantas. Otro de los factores críticos de diseño es la forma de duchar las bandejas, pues de ello depende la homogeneidad del riego de las algas y el mantenimiento de una humedad óptima y la operatividad del sistema

El cultivo en tanque es el sistema más comúnmente utilizado para la producción de macroalgas en tierra. Se suelen utilizar contenedores de diversos materiales y formas siendo los más comunes los tanques rectangulares o de fondo cóncavo. Las principales variables que afectan la producción en este tipo de sistemas son, además de las variables físico-químicas (radiación solar, temperatura ambiente, nutrientes incluido el dióxido de carbono), las características técnicas como la forma del tanque y el movimiento del agua. Comúnmente, la agitación se logra utilizando aireadores, que mediante tuberías localizadas en el fondo del tanque, generan una circulación adecuada del agua y permiten la exposición periódica de las plantas a la luz en la superficie.(Robledo Ramírez, 1993).

El sistema que más se emplean son tanques tipo pista. Es el sistema de cultivo más utilizado por su bajo coste de operación y alta eficacia de producción de superficie de cultivo útil, agitación por paletas e incorporación de CO₂ en aire por difusión. Los estanques se llenan con agua (10 cm de profundidad) en la que diluyen los nutrientes y seguidamente se conecta el sistema de difusión de aire. El parámetro más importante para la configuración del tanque es la relación altura/ancha que, deberá ser más pequeña que 1. Para una circulación óptima se usarán soplantes axiales, mientras que la profundidad del agua no excederá de 1 m. Tanques más profundos obligarán al uso de compresores de aire más costosos, por lo cual, el

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

aumento de la anchura del tanque para mantener la relación altura/ancho más pequeña que 1, disminuye la eficiencia de la circulación del agua obtenida con una sola fila.

Los estanques (o pistas) en un tamaño total de 1 ha se diseñan para dar una idea de equipamiento que se necesita y de los costos para la inversión y costos de operación, se diseñan 4 estanques, cada uno de 2500 m² con una longitud de 100 m y un ancho de 25 m.

Los estanques se hacen de concreto con una altura de 0,6 m y la profundidad de agua es 0,3 m. El fondo es plano. Los estanques se disponen dos a dos con una distancia de 15 m para hacer simple el sistema de tuberías y el transporte de las macroalgas.

El sistema de tuberías para agua salada se dispone en el medio entre los 4 estanques. La distancia hasta la toma de agua es de hasta 400 m y la altura máxima sobre el nivel del mar es de 5 m.

La rentabilidad del cultivo de las macroalgas en estanque de pista depende de una maximización de la producción de biomasa con un mínimo consumo de energía y mano de obra. Así, es crucial el control automático de un número de parámetros, tales como el flujo de agua, la adición de nutrientes y CO₂ (Kadar & Thomsen, 2010).

Diferentes diseños de sistemas para el cultivo libre de macroalgas que abarcan un amplio rango de superficies-aéreas y volúmenes, y que van desde tanques de 0,2 m (90 L) hasta “raceways” de 60 m (12.000 L), han sido utilizados para evaluar datos de producción y capacidades de biofiltración de un amplio número de especies. Estas han sido ensayadas durante periodos de tiempo que en algunos casos superan los 15 años de cultivo continuado, como son los casos del alga rodofita *Hydropuntia cornea* (anteriormente *Gracilaria cornea*) y la clorofita *Ulva rígida*. (Gómez, 2012)

La empresa holandesa Algaelink, ubicada en Roosendaal, ha desarrollado una tecnología que acelera el crecimiento de las algas, informando que llegan a duplicar su masa cada 24 hs. La empresa ha desarrollado un fotobiorreactor que optimiza el proceso fotosintético natural. Las algas necesitan agua y CO₂ para crecer y mínimos aportes de otros elementos minerales. La temperatura óptima está entre los 15°C y los 25°C. Para producir un kilogramo de algas es necesario aplicar de 2 a 3 kilogramos de CO₂.

El fotobiorreactor de Algaelink está conformado por tubos transparentes de la longitud que interese proyectar, con las algas en su interior en un medio de agua y CO₂, a la temperatura óptima e iluminados. Las algas finalmente son cosechadas mediante un filtro de diseño

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

patentado ubicado en el extremo del fotobiorreactor. Todo el sistema es monitoreado por computación mediante un software diseñado especialmente, controlándose automáticamente la densidad del alga, los nutrientes, CO₂, luz y temperatura (Algaelink, 2009)

1.7.1 Estación para estudios experimentales.

Estudios de (Barsanti & Gualtieri 2006), reportan el CO₂ en la nutrición de las macroalgas, y de las algas en general que viven en el agua o en ambientes muy húmedos (alguna excepción colonizó la tierra). Con respecto a sus modos de nutrición, no todas las algas son exclusivamente autótrofas, hay algas que además de realizar fotosíntesis pueden alimentarse de forma heterótrofa (son mixótrofas).

Según estos autores los cultivos de algas pueden ser autotróficos, heterotróficos o mixotróficos. En el caso de heterotróficos la fuente de carbono es adicionada al medio, los cuales pueden ser efluentes industriales o domésticos.

Actualmente se utilizan dos tipos de mecanismos productores de CO₂: el método casero por fermentación de levadura y el método del equipo de inyección de CO₂.

De estos el método más utilizado es el de inyección de CO₂, que posee ventajas como: es fácil de controlar los niveles de CO₂, con un controlador electrónico aseguramos un grado exacto en todo momento de pH. No importa si hay muchas o pocas plantas, si es de día o de noche porque el equipo se encarga de liberar sólo el gas exacto que las plantas consumen y se tienen que utilizar productos químicos (ácidos y bases) para regular el pH con el peligro de alterar el equilibrio ecológico del medio, aunque como inconveniente presenta que el equipo es caro.

En cuanto a la regulación del suministro de CO₂, su nivel es el que las plantas necesitan. Se puede añadir más de lo necesario pero, si no hay suficiente, aparecerán problemas de debilidad de crecimiento de la plantación y de proliferación de algas. La cantidad que las plantas necesitan está relacionada con la cantidad de luz, puesto que la luz es lo que marca el ritmo de crecimiento.

Se necesita un nivel muy alto, en el entorno de 30-60ppm, con luz intensa, de 20-30ppm para luz mediana y 10-20ppm con poca luz. Es decir que se puede añadir CO₂ de botellón

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

hasta niveles de 30ppm tanto en un acuario de luz intensa de 1vatio por litro como la misma cantidad en un acuario de sólo 0,3 vatios por litro. En el segundo caso estamos añadiendo más de lo necesario pero esto no es ningún inconveniente y en el primer caso se le agrega justo lo que se necesita para soportar el crecimiento intenso.

Una disolución mayor de 50ppm no produce mayor crecimiento, ni siquiera con luz muy intensa, por lo que es innecesario superar este límite. En cambio siempre se puede agregar 30ppm, incluso en tanques poco iluminados que no lo utilizan por completo, así se asegura que el CO₂ no sea un problema.

1.8 Incorporación y medición de CO₂ en un sistema de cultivo.

La decisión de incorporar un equipo de botellón de CO₂ no es algo sencillo, se tiene que afrontar un costo bastante elevado, y la complicación de sus múltiples elementos de que tiene que estar compuesto. En la Figura 1.5 se muestra el esquema del sistema de incorporación de CO₂. Los componentes del equipo de inyección de CO₂ son: botellón(1), regulador de presión(2), electroválvula (solenoides)(3), computador de pH(4), contador de burbujas(5), sonda de pH(6), difusor o reactor(7).

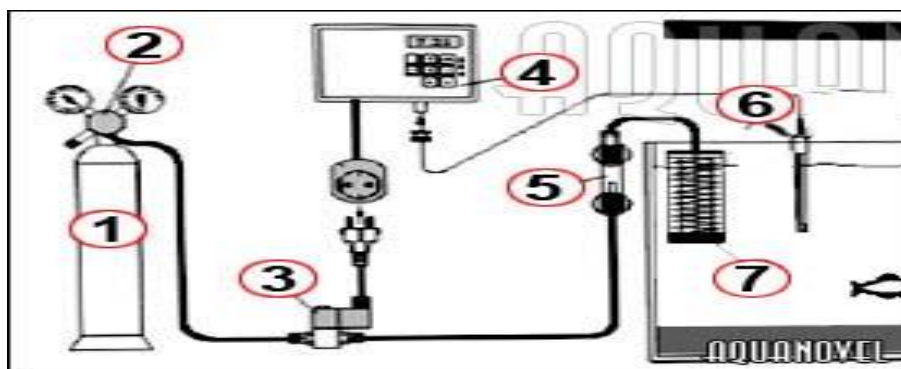


Figura 1.5 Sistema de incorporación de CO₂.

Por exceso de CO₂ la primera señal se da cuando los caracoles tienden a salir del agua o mueren. Otros invertebrados como las gambitas también son muy sensibles y se ponen nerviosas, nadan muy agitadas o mueren. Si esto ocurre hay que disminuir de inmediato el aporte de CO₂. La observación del comportamiento de caracoles es un buen indicativo, si vemos que se acumulan en la zona superficial y fuera del agua es señal de que tenemos un

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

exceso y debemos bajar el nivel de inyección. Con este método de observar los caracoles o también el nerviosismo de las gambitas, podemos ahorrar el medir niveles de CO₂.

Por defecto de CO₂ el síntoma es la aparición de algas, pero este signo puede ser debido a otros factores como la falta de nutrientes. Cuando hay poco CO₂ se debe aumentar la inyección de ese gas o bien reducir la intensidad de luz, de este modo se controlan las algas. Otro indicativo de falta de CO₂ es cuando las plantas no llegan a burbujear ni siquiera a últimas horas de la tarde.

El carbono orgánico no es tóxico y puede combinarse sin ningún inconveniente con el CO₂ de botellón. Si le añadimos CO₂ de bombona no es perjudicial sino que se complementa perfectamente y da la posibilidad de un crecimiento intenso como el que se requiere.

La utilización conjunta de gas CO₂ y de sustrato a base de mantillo vegetal, es la combinación que da un mejor resultado en el crecimiento fuerte, completo y en el colorido de las plantas.

La desventaja del uso del carbono orgánico procedente del sustrato es que su presencia disminuye muchos pasados unos 12 meses. Entonces debe basar principalmente en el uso del CO₂.

El dióxido líquido que se vende comercialmente es también una forma de carbono orgánico, similar en comportamiento al carbono liberado por la materia orgánica. Con este método se suministra el carbono necesario para sustentar el crecimiento de plantas siempre y cuando el tanque tenga un ritmo lento. Con este método de CO₂ líquido se ahorra todo el montaje de botellón y accesorios caros y complicados, donde se consigue una excelente plantación, siempre y cuando se mantenga con una iluminación media-baja. Siempre ha de tenerse en cuenta que el carbono líquido no puede satisfacer las necesidades de crecimiento de las plantas con una iluminación superior a los 0,3W/L. Con luz más intensa no se puede proveer el carbono necesario utilizando únicamente esta fuente de carbono (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Capítulo I: Marco Teórico de la Investigación.

Conclusiones parciales.

1. Se selecciona la macroalga *Ulva lactuca* como la especie de estudio en este trabajo, por su disponibilidad y características ya que se desarrolla en abundancia en la costa sur de nuestro país y tiene un alto contenido en vitaminas, siendo la biomasa final una fuente potencial de alimento animal.
2. El CO₂ es uno de las fuentes fundamentales de carbono para el crecimiento intensivo de algas, siempre que no exista escases de los demás nutrientes requeridos y una posible fuente de la reducción de la contaminación ambiental por emisiones industriales de CO₂.
3. El cultivo en estanque y canales tiene varias ventajas sobre los sistemas de cultivo en el mar, ya que la productividad por unidad de área es mayor, a la vez que los procesos de producción pueden ser controlados y mecanizados, disminuyendo su costo.
4. Existen referencias de este tipo de estudio, llevados a cabo en diferentes medios de biorreacción como estanques y canales que pueden comportarse como biorreactores tipo tanque, por lo que se argumenta en este capítulo los modelos de flujo no ideales de mezcla perfecta para los reactores tipo tanque agitado.
5. Es factible la continuidad de las investigaciones en el cultivo intensivo del alga *Ulva lactuca*, atendiendo a los estudios reportados en la literatura sobre la utilidad de la biomasa generada como portador energético y fuente de productos de alto valor agregado.

Capítulo II. Evaluación del sistema experimental para el cultivo intensivo de la macroalga marina *Ulva Lactuca*.

2.1 Sistema experimental para el cultivo intensivo de la macroalga *Ulva lactuca*.

Mediante el desarrollo de una estación de cultivo intensivo de macroalgas marinas a nivel de laboratorio, se pueden desarrollar investigaciones fundamentales que permitan obtener información sobre las condiciones de cultivo, influencia de los nutrientes y parámetros de diseño. Para la continuidad del desarrollo de una tecnología de cultivo intensivo de esta especie, con el propósito de disminuir las concentraciones de CO₂ en el aire y producir cantidades apreciables de biomasa algal como fuente de productos químicos, bioquímicos y alimenticios. Por las razones anteriormente expuestas, se han continuado los estudios e investigaciones a nivel de laboratorio en el Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC), utilizando algas marinas de la especie *Ulva Lactuca*, abundantes en el litoral Sur.

2.2 Descripción del proceso.

El cultivo de macroalga a escala de laboratorio, se realiza en un tanque rectangular tipo pecera, simulando un biorreactor Continuo con Agitación (RCCA), el cual se mantiene con un flujo de alimentación de agua de mar constante, asegurando una operación continua estacionaria, con un tiempo de renovación de 12 horas y un flujo de aire y CO₂ mezclados, con una concentración de CO₂ de 760 ppm, que a su vez constituyen el medio de agitación. El agua procedente de la bahía se le añade un medio de cultivo (nutrientes) para garantizar una calidad adecuada y lograr un mayor rendimiento de la salgas en un menor periodo de tiempo.

Para realizar el estudio se selecciona la especie de alga *Ulva lactuca*, más conocida como Lechuga de Mar, la cual se extrae de su habitat natural, (Bahía de Cienfuegos). El principal objetivo de la investigación es evaluar una estación experimental para la determinación del consumo de nutrientes, el rendimiento de biomasa, la producción de oxígeno disuelto (OD) y mantener el control del flujo de gases y agua. Se evita con rigor que la biomasa algal no se escape en el flujo de descarga del biorreactor.

*Capítulo II: Evaluación del sistema experimental para el cultivo intensivo de la macroalga marina *Ulva Lactuca*.*

Tabla 2.1 Concentraciones de los compuestos por litro de agua de mar para el Medio de Cultivo de Macroalgas Marinas (Von Stosch, 1963).

NaNO ₃	42,50 mg
PO ₄ HNa ₂	10,75 mg
(NH ₄) ₂ Fe (SO ₄) ₂ , 6 H ₂ O	278, 00 µg.
Cl ₂ Mn, 4H ₂ O	19, 80 µg.
EDTA - NO ₂ , 2 H ₂	3,72 mg
Tiamina HCL (B1)	0,2 mg
Biotina (H)	1,00 µg.
Cianocobalamina (B12)	1,00 µg.

Nota: Se pueden sustituir las vitaminas por sustrato de suelo.

Para la preparación del sustrato de suelo la muestra no debe contener aplicaciones de fungicidas, ni insecticidas, debe haber la menor cantidad posible de arcilla. Se mezcla un volumen de tierra en dos de agua destilada y se coloca en una autoclave de 40 a 60 min o en baño de María donde debe hervir por más de 60 min agitando constantemente. Dejar el caldo reposar durante la noche y luego filtrar. Se le añade 1 ml de sustrato por litro de agua.

2.3 Preparación de la muestra para el cultivo.

En la preparación de la *Ulva Lactuca* para el cultivo, se tomó una muestra de su ambiente natural. Luego de ser seleccionadas se les retiran todos los organismos que no son de interés para el estudio, así como otras especies de algas y sólidos que se encuentren ajenos a su especie, cuando esta esté parcialmente limpia es sometida a un lavado con agua de mar quedando lista para su cultivo.

2.4 Diseño y montaje para del sistema experimental a escala de Laboratorio.

El biorreactor continuo de tipo rectangular con agitación (RCCA) tiene un volumen de 6 litros, el cual opera con un flujo de agua de mar constante, el flujo de alimentación de agua es renovada en un tiempo de 12 h similar al ciclo natural de llenado de la bahía. Se utiliza un minicompresor que inyecta aire con un flujo contante través de un distribuidor de gases, conectada a la línea de aire se encuentra una línea de CO₂, suministrado por un balón de CO₂, para efectuar la mezcla de ambos gases, constituyendo así el medio de agitación, la

Capítulo II: Evaluación del sistema experimental para el cultivo intensivo de la macroalga marina *Ulva Lactuca*.

presión del CO₂ es controlado por un regulador de gases. El flujo de aire y CO₂ es controlado mediante válvulas y flujómetros.

Se utilizan dos tanque (A y B) conectados entre sí, lo cual permite asegurar un flujo estacionario en la operación por gravedad, el tanque B se cierra herméticamente para que la presión hidrostática sea constante y por lo tanto el volumen se mantiene de igual manera logrando una succión mediante el vacío, alimentando el biorreactor a través de una tubería de goma. La descarga de agua del biorreactor se realiza del fondo para evitar los defectos de flujo de desvío, para esta operación también se utilizan tuberías de goma.

Todo el sistema funciona por gravedad por lo que se necesitan válvulas para controlar los flujos de entrada y salida del biorreactor. El sistema experimental se muestra en la Fig. 2.1.

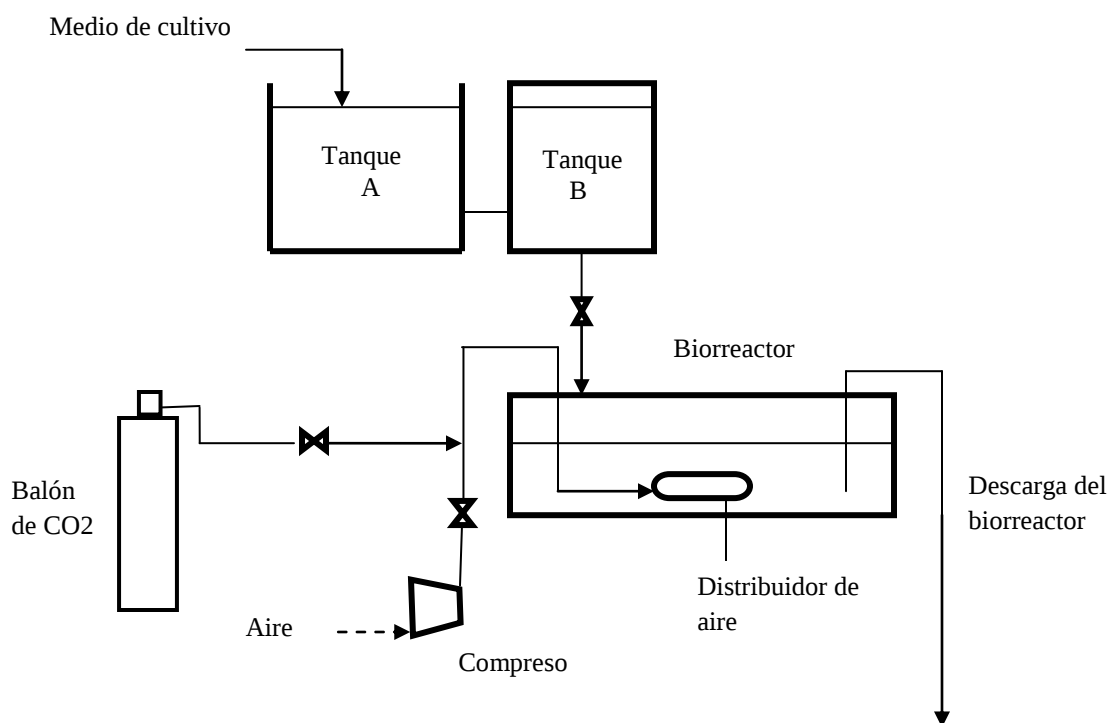


Fig. 2.1 Diagrama de flujo del sistema experimental del cultivo intensivo de macroalga a escala de laboratorio.

Datos del biorreactor a escala de laboratorio.

Altura: 20cm

Largo: 40cm

Ancho: 19,8cm

Nivel del líquido: 7,58cm

Volumen utilizado: 6 l

*Capítulo II: Evaluación del sistema experimental para el cultivo intensivo de la macroalga marina *Ulva Lactuca*.*

Flujo de aire: 1 l/min

Flujo de CO₂: 0,0005 l/min

Área superficial: 792 cm²

Área lateral: 906,57

Área de iluminación total disponible: 1698,57 cm²

2.5 Determinación del flujo de agua de entrada y salida del biorreactor.

Para la renovación de 6 litros del agua en el biorreactor en un período de tiempo de 12 horas, es necesario mantener un flujo de 0,5 l/h = 8,33 ml/min, utilizando el método de tanteo y error se logra calcular el flujo, mediante una probeta y un medidor de tiempo.

Según la expresión:

$$\tau = \frac{V}{q_0}$$

Donde:

τ : Tiempo espacial V: volumen q_0 : flujo

2.6 Determinación del flujo de Aire y CO₂

Se suministra un flujo de aire + CO₂ que alcance unos 760 ppm (mg de CO₂/Kg de Mezcla de Aire + CO₂).

Para alcanzar aproximadamente la proporción necesaria:

F (Flujo de CO₂) -----0.0005 litros /min = 0.03 litros/hora

Cte. Volumétrica de los gases= (22.4 litros/mol de gas)

(Peso molecularCO₂) g/mol= 44 g/mol

F_{CO2}= (0.0005 l/min* 1/22.4 l/mol * 44 g/mol)

F_{CO2}= 0.000982 g/min

F_{aire}=(1 l/min * 1/22.4 l/mol * 29 g/mol)

F_{aire}= 1,294 g/min

Mezcla (Aire + CO₂) = 1,2956 g/min

*Capítulo II: Evaluación del sistema experimental para el cultivo intensivo de la macroalga marina *Ulva Lactuca*.*

Base 1 min de operación:

$$\% \text{CO}_2 = (0.000982 / 1,2956) = 0.076 \%$$

$$0.076 \text{ gCO}_2 / 100\text{g de Mezcla} = 0,076 * 10^4 \text{ ppm} = 760 \text{ g CO}_2$$

Si hay 0.076 g en 100g de mezcla.

Como 1ppm (1g de CO₂/10⁶ g de Mezcla)

$$\text{ppm CO}_2 = 0,076 * 1000000 / 100 = 760 \text{ ppm}$$

Mezclar 1 l/min (60 l/h) de Aire con 0.0005 l/min (0,03 l/h) de CO₂ para asegurar una composición en la mezcla de 760 ppm de CO₂.

Para mezclarlo es necesario usar un dispositivo de unión en Y y lograr una presión de CO₂ ligeramente superior a la de Aire para ayudar a la corriente Aire a arrastrar el CO₂ que puede entrar en su seno.

2.7 Determinación del peso inicial y final

Se coloca la muestra de algas en un papel de filtro o papel absorbente durante 15 minutos aproximadamente y secándola frecuentemente con otro por encima, retirando la mayor cantidad de agua presente en la misma. Posteriormente se pesa en la balanza analítica obteniendo un peso húmedo inicial (P_i). En un período de tiempo de 4 días, se retira del biorreactor la muestra de *Ulva Lactuca* realizándole un segundo pesaje final (P_f). Lo que permite determinar el rendimiento húmedo de la biomasa (R_h) en el biorreactor en un período de tiempo de 4 días:

$$R_h = \frac{P_f - P_i}{P_i}$$

$$R_h = \frac{72,8 - 43,2}{43,2}$$

$$R_h = 0,685 * 100$$

$$R_h = 68,5\%$$

2.8 Determinación de biomasa seca de la *Ulva lactuca*.

- Partiendo del peso inicial y final de la biomasa

Peso húmedo inicial: 43,2 g.

Peso húmedo final: 72,8 g.

*Capítulo II: Evaluación del sistema experimental para el cultivo intensivo de la macroalga marina *Ulva Lactuca*.*

Biomasa húmeda generada en 4 días 29,6g, obteniendo una velocidad de crecimiento igual a 7,44 g/día de masa algal húmeda.

- Se toma la biomasa húmeda final se coloca al sol durante 4 horas con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de humedad posible. Luego se pone en la estufa Ecocell a menos de 60°C hasta mantener un peso constante, obteniéndose finalmente la biomasa seca.

Peso seco: 7,9 g obteniendo un 89,15% de agua contenida en la muestra, representando un 10,85% de biomasa seca.

Total de biomasa seca generada:

$$(29,6) * 0,1085 = 3,21 \frac{g}{4 \text{ días}}, \text{ equivalente a } 0,8 \frac{g}{\text{días}}$$

2.9 Determinación de la cinética de reacción considerando una reacción de primer orden sobre la base de biomasa generada.

La conversión de la biomasa (X_{nf}) se determina mediante la expresión

$$X_{nf} = \frac{CR_0 - CR_f}{CR_0}$$
$$X_{nf} = \frac{(-43,2 + 72,8)}{43,2} = 0,69$$

Para un volumen total (V_T) de agua de mar de 6 litros y un flujo de 0,5 l/h se obtiene un tiempo espacial (τ) de 12 h.

El biorreactor opera como RMP en cuanto al flujo de agua de mar que circula en el mismo, sin embargo la biomasa alga (Fase solida) no fluye del sistema y por tanto puede considerarse como un crecimiento que ocurre en condiciones discontinuas durante toda la etapa de operación del Biorreactor (4 días).

Atendiendo a esta consideración es posible proponer el cálculo de la cinética aparente del proceso de crecimiento algal sobre la base de la ecuación de diseño del Reactor de Discontinuo y la del consumo de nutrientes sobre la base de un reactor de mezcla perfecta RMP.

*Capítulo II: Evaluación del sistema experimental para el cultivo intensivo de la macroalga marina *Ulva Lactuca*.*

Cálculo de la constante de cinética de reacción aparente derivada de la ecuación de diseño del Reactor Discontinuo (kB) como una valoración preliminar dada la limitación de los estudios experimentales para efectuar un estudio preciso de la cinética de crecimiento algal.

Por tanto:

$$CB/CB_0 = e^{-kB t}$$

$$kB = -\ln(1 - XB)/t$$

Donde:

XB = biomasa generada durante cuatro días de operación del biorreactor

t = tiempo total de crecimiento de macroalgas durante 4 días en el biorreactor (96h)

$$kB = -\ln(1 - 0,69)/96 = 0.0122 \text{ h}^{-1}$$

$$kB = 0.0122 \text{ h}^{-1}$$

Cálculo de la constante cinética aparente de la reacción de consumo de Ortofosfato como criterio de consumo de nutrientes en el proceso de cultivo intensivo de macroalgas en el RMP

$$K_0 = (X_{of} - X_{oi}) / (1 - X_{of}) * \tau$$

Donde:

K₀ = Constante cinética aparente del consumo de Ortofosfato

X₀ = Conversión de Ortofosfato

τ = Tiempo espacial del fluido en el reactor (12 h)

$$k_0 = 0,789 / (1 - 0,789)12$$

$$k_0 = 0,3112 \text{ h}^{-1}$$

La evaluación del comportamiento del sistema de biorreacción, se realizó además, mediante los ensayos químico - físicos, en los cuales se ha determinado la concentración de nitratos, nitritos, fosfato inorgánico disuelto y del Oxígeno disuelto, en el tanque de alimentación y en la corriente de salida del biorreactor.

Se determinó el fosfato inorgánico disuelto (P-PO₄³⁻) por Espectrofotometría por formación del complejo fosfomolibdato, en Espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS; Nitritos (N-NO₂⁻) por Espectrofotometría por formación del complejo diazo de color rojo; Nitratos (N-NO₃⁻) por Espectrofotometría por reducción con hidracina y posterior formación del complejo diazo de color rojo, todos en un Espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS. Se determinó el oxígeno disuelto por el método Winkler (por volumetría).

Capítulo II: Evaluación del sistema experimental para el cultivo intensivo de la macroalga marina Ulva Lactuca.

Tabla 2.2 Resultados experimentales del sistema de biorreacción.

Parámetros	Muestras	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Conc. en la entrada del biorreactor (mg/l).	P-PO₄³⁻	0,292	1,4	1,45	3,63
Conc. en la salida del biorreactor (mg/l).		0,0614	0,169	0,527	0,98
Conversión		0,789	0,879	0,636	0,7305
k (h ⁻¹)		0,312	0,607	0,145	0,225
Conc. en la entrada del biorreactor (mg/l).	N-NO₃⁻	3,22	4,22	13,4	9,1
Conc. en la salida del biorreactor (mg/l).		0,0075	0,00414	0,109	3,31
Conversión		0,997	0,999	0,991	0,636
k (h ⁻¹)		35,69	84,860	10,161	0,145
Conc. en la entrada del biorreactor (mg/l).	N-NO₂⁻	0,00116	0,00402	0,0077	0,0086
Conc. en la salida del biorreactor (mg/l).		0,00086	0,00064	0,00258	0,00594
Conversión		0,258	0,840	0,664	0,309
k (h ⁻¹)		0,0297	0,440	0,165	0,037
Conc. en la entrada del biorreactor (mg/l).	OD	6,8	6,9	7,2	7,2
Conc. en la salida del biorreactor (mg/l).		7,8	7,5	8,3	8,3
Conc. en la entrada del biorreactor.	pH	8,05	8,21	8,23	8,09
Conc. en la salida del biorreactor.		7,69	7,27	6,67	7,5
Temp. en la entrada del biorreactor (°C).	Temperatura	25,5	26,6	22,7	25,2
Temp. en la salida del biorreactor (°C).		24,6	22,9	26,2	26
Conc. en la entrada del biorreactor (ppt).	Salinidad	36	35,8	36,5	37,8
Conc. en la salida del biorreactor (ppt).		36,9	37,4	37,3	38

Las siguientes figuras muestran el comportamiento de los parámetros analizados en el sistema de biorreacción.

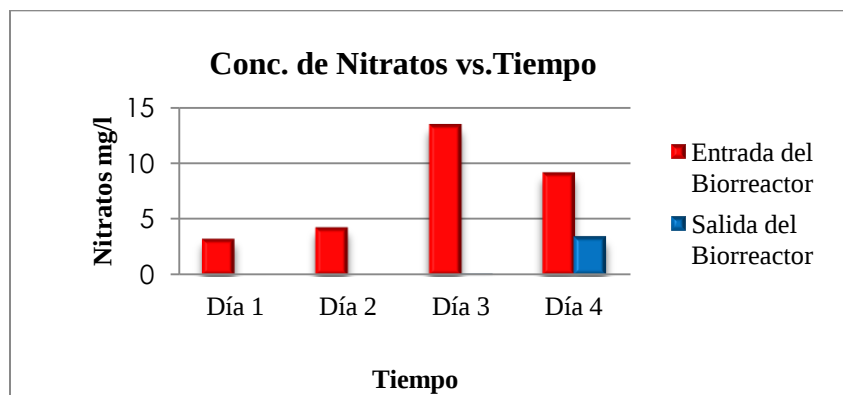


Figura 2.2: Concentraciones de Nitratos, en la entrada y salida del biorreactor.

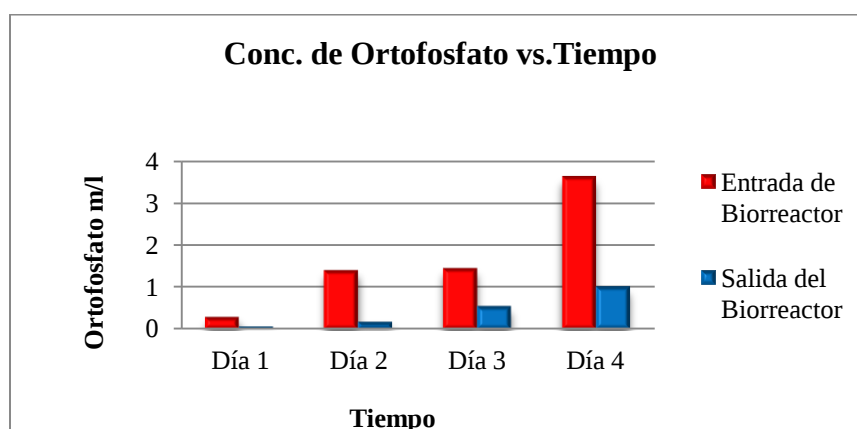


Figura 2.3: Concentraciones de Ortofosfato, en la entrada y salida del biorreactor.

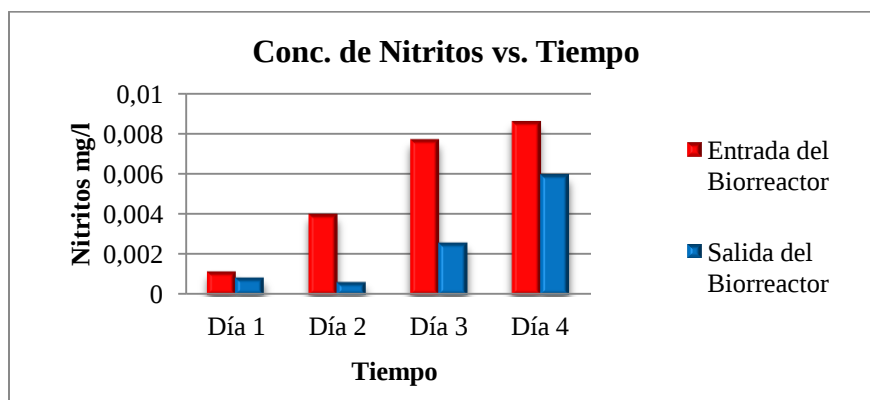


Figura 2.4: Concentraciones de Nitrito, en la entrada y salida del biorreactor.

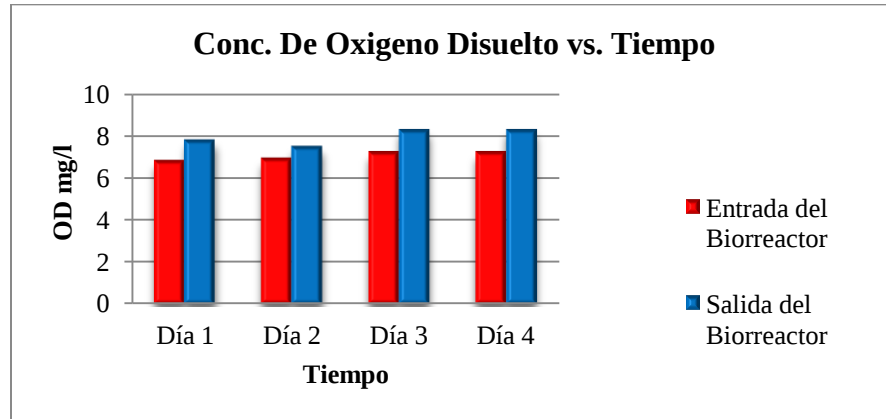


Figura 2.5: Concentraciones de Oxígeno Disuelto, en la entrada y salida del biorreactor.

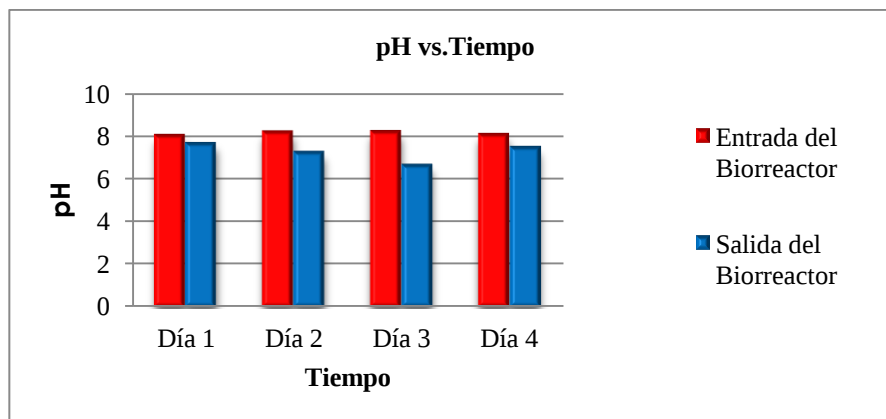


Figura 2.6: Valores de pH en la entrada y salida del biorreactor

2.10 Balance de masa de $P-PO_4^{3-}$, $N-NO_3^-$, $N-NO_2^-$ en el agua de mar.

Acumulación = Entrada - Salida + Generación - Consumo

Acumulación es (0) no hay acumulación.

La generación es (0), porque no existe generación de N_2

Tomando como base de cálculo 1 h, se tiene:

Consumo = Entrada – Salida

Consumo = $F_{\text{entrada}} * CA_{\text{entrada}} - F_{\text{salida}} * CA_{\text{salida}}$

Tabla 2.3 Resultados de los balances de masas.

Muestras	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
P-PO₄³⁻	0,1153	0,6155	0,4615	1,325
N-NO₃⁻	1,60625	2,10793	6,6455	2,895
N-NO₂⁻	0,00015	0,00169	0,00256	0,00133

Resumen comparativo de las conversiones experimentales de Ortofosfato, Nitrato y Nitrito.

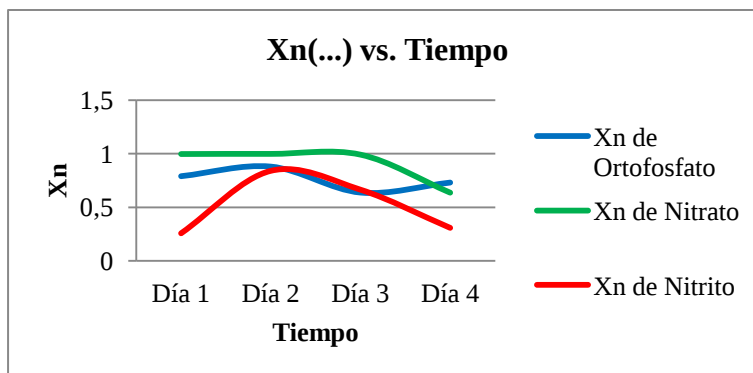


Fig. 2.7 Xn de Ortofosfato, Xn de Nitrato, Xn Nitrito vs. Tiempo.

2.11 Comparación de la eficiencia del desarrollo del cultivo intensivo de las algas.

En estudios realizados por (Fernández Avilés., 2012), para las mismas condiciones de operación como flujo de alimentación de agua de mar y geometría del biorreactor, pero condiciones de diseño diferentes como geometría del areador, un flujo de aire mayor y un flujo de CO₂, se obtuvieron similares resultados. En la Tabla 2.4 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en cada caso.

Tabla 2.4 Resumen comparativo de los resultados obtenidos cada estudio.

Condiciones operacionales	Pi (g)	Pf (g)	BHG(g)	MS (%)	MSG (g/día)	Xnf	K (h ⁻¹).
Primer Estudio	48,31	76,33	28,02	10,85	0,6	0,58	0,0072
Segundo Estudio	43,2	72,8	29,6	10,85	0,8	0,69	0,0122

Pi- Peso Húmedo inicial de la biomasa.

Pf- Peso Húmedo final de la biomasa.

BHG- Biomasa húmeda generada.

MS- % de materia seca.

MSG- Masa seca generada.

Xnf- Conversión de biomasa

K- Constante cinética de la biomasa.

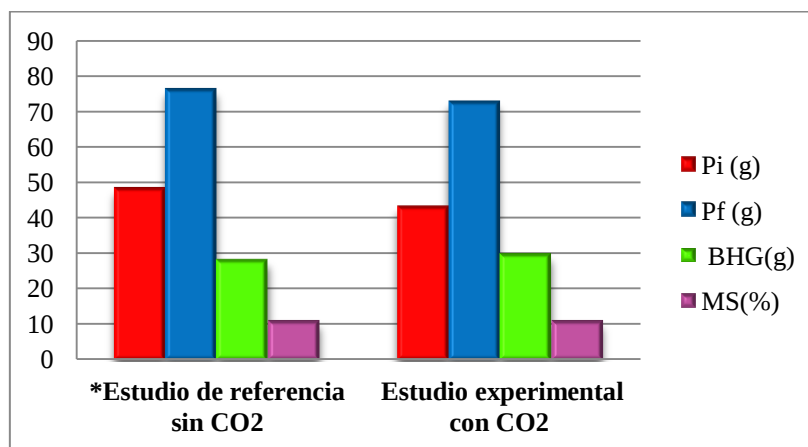


Figura 2.8.1 Resumen comparativo de los resultados experimentales.

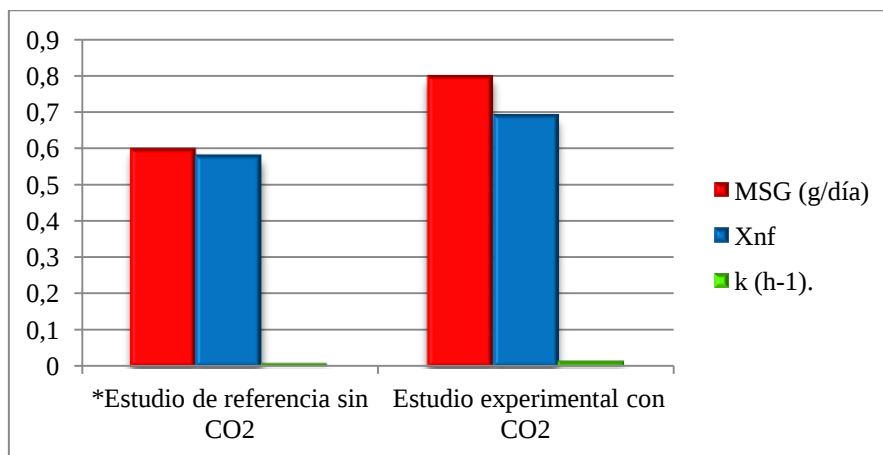


Figura 2.8.2 Resumen comparativo de los resultados experimentales.

*Estudio de referencia es el estudio realizado por (Fernández Avilés., 2012).

Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos en este trabajo como se observa en la figura 2.8.1 y 2.8.2, son superiores, en comparación con los resultados reportados por (Fernández Avilés., 2012) en estudios anteriores. En cuanto a los resultados experimentales del sistema de biorreacción, la conversión es un 10% superior, por lo que hubo un mayor rendimiento de biomasa tanto húmeda como seca. La constante cinética obtenida esta en correspondencia con una eficiencia mayor del proceso, lo que corrobora la ventaja del suministro de CO₂ en el cultivo intensivo de macroalgas y como consecuencia el beneficio ambiental de utilizar el CO₂ industrial en este proceso de producción de biomasa algal.

La Figura 2.2 muestra comportamiento de iones Nitrato (N-NO₃⁻) el donde se observa una disminución apreciable de la concentración de estos iones en la salida del biorreactor a medida que va pasando el día, viéndose una alta concentración en la entrada del biorreactor durante el tercer y cuarto día manteniendo un eficiente consumo debido al crecimiento.

En la Fig.2.3 se aprecia un comportamiento similar a la figura anterior, donde el fosfato (PO₄³⁻) mantiene una disminución de sus iones, viéndose un consumo relativo durante toda la corrida, aunque el quinto día se observa una elevada concentración en la salida debido a que se retiraron las muestras antes que terminara el día para su posterior proceso, viéndose de esta misma manera el comportamiento del nitrito (N-NO₂⁻) que se muestra en la Fig.2.4.

En la Figura 2.5 existe un incremento neto de oxígeno disuelto en el biorreactor, producto de la reacción de fotosíntesis que ocurre en este, demostrando que medida que pasan los días existe un incremento de la biomasa.

En la Figura 2.6 se observa el comportamiento del pH durante la semana, podemos observar que se mantuvo un pH controlado entre 7 y 8, por las mañanas el mantenía valores de 8 característico del pH de agua de mar y por la tarde disminuía a valores de 7 debido al uso del CO₂, aunque el tercer día hubo una disminución a 6.67 provocado por pequeño descontrol de la válvula de CO₂.

La tabla 2.3 se refleja el resultado del balance de masa efectuado en el biorreactor de los parámetros analizados los cuales tienen un resultado positivo demostrando el consumo eficiente de Nutrientes.

Conclusiones parciales

1. Se obtienen mejores resultados en cuanto a % conversión y biomasa generada en el cultivo realizado con CO₂ a 760ppm y el aireador circular, comparado con el cultivo realizado sin suministro adicional de CO₂, en el mismo biorreactor con areador dispuesto longitudinalmente, según lo reportado por (Fernández Avilés., 2012)
2. Se demuestra la ventaja del dióxido de carbono como materia prima nutriente en el cultivo intensivo de algas marinas y las perspectivas de ser empleado para el tratamiento del CO₂ residual industrial, como una vía para mitigar la contaminación atmosférica y producir una biomasa algal como materia prima en otros usos.
3. Se observa un consumo apreciable en los nutrientes contenidos en el agua de mar que se emplearon como control del proceso en el sistema de biorreacción debido al crecimiento de la biomasa algal. El contenido de estos nutrientes aumenta diariamente al inicio del día debido a que siempre se alimentó al comienzo la misma cantidad de nutrientes en la alimentación al remanente del proceso del día anterior, lo cual indica la necesidad de estudiar en detalles la posible recirculación de agua de mar en próximas experiencias, para ahorro en el proceso por este concepto.
4. Se corrobora además, el proceso de Fotosíntesis con el comportamiento del O₂ controlado en el proceso de reacción durante la experimentación.
5. El efecto del pH no varía apreciablemente en el proceso de reacción no obstante el suministro de CO₂ efectuado en la experimentación.

Capítulo III. Propuesta de un sistema experimental piloto para el cultivo de macroalgas marinas con uso de Dióxido de Carbono como nutriente.

Para realizar la propuesta de la instalación del sistema de biorreacción a escala piloto se hace necesario el estudio de los defectos de flujo del sistema de biorreacción a escala de laboratorio para lograr un escalado más efectivo del sistema. El escalado se efectúa para un volumen de 1m^3 . Bajo las condiciones similares de operación a escala de laboratorio.

3.1 Determinación de los defectos de flujo del biorreactor experimental. Propuesta del modelo de reacción.

Para realizar los estudios de defectos de flujo del biorreactor a escala de laboratorio se efectúa bajo las mismas condiciones de los experimentos realizados en el capítulo anterior. Se toma la misma cantidad de muestra que se utilizó en el experimento, se le retiran todos los cuerpos extraños que no son de interés, se regulan los flujos de entrada y salida de agua de mar, el flujo de aire y CO_2 , cuando el sistema este operando en perfectas condiciones se sustituye el flujo de agua de mar por el del trazador, en este caso se utilizó agua natural, si el sistema está funcionando lo más cercano al modelo ideal el agua de mar de ser sustituida en un período de 12 horas con un flujo de entrada y salida de $0,5\text{l/h}$ para un volumen de agua de 6 litros. Luego se realiza la corrida donde se mide la salinidad cada 30 minutos (Ver Anexo 1).

Utilizando las ecuaciones siguiente se determina:

- Área efectiva del biorreactor.

$$\text{Área} = \frac{V_m}{v} = \sum \left[\left(\frac{h}{2} * (y_0 + 2 * y_1 + 2 * y_2 + \dots + y_n) \right) \right]_0^2$$

$$\text{Área} = 0,827\text{m}^2$$

V: Volumen real del reactor.

$$h = \Delta t$$

$$y_n = 1 - F_0$$

- Volumen efectivo del biorreactor.

$$V_m = A_{\text{Área}} \cdot v_{\text{Volumen}}$$

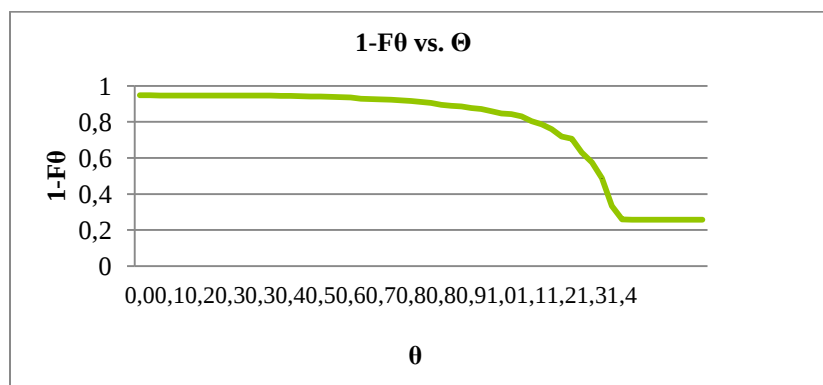
$$V_m = 4,966$$

- Tiempo espacial del modelo ideal, (h).

$$\tau = \frac{V_m}{V_0} = \frac{4,966}{0,5} = 9,932h$$

En la Figura 3.1 se muestra el comportamiento del sistema de biorreacción evaluado a escala de laboratorio, lo que indica que el biorreactor se comporta como un sistema de mezcla perfecta.

Figura 3.1 Comportamiento del flujo del biorreactor.



Análisis de los resultados:

Como se observa el modelo de flujo que caracteriza al biorreactor experimental presenta defectos de flujos por aguas muertas (Área efectiva es 0,827m², V_m: 4.966 litros y el tiempo espacial: 9,932 h) lo que representa 83,2% del volumen real del biorreactor de laboratorio, esta condición deberá tenerse en cuenta cuando se realice el escalado. Es decir el reactor a escala piloto para realizar los estudios deberá considerar que opera como si su comportamiento fuera ideal con un 16,8 menos del volumen seleccionado, lo cual incidirá en el tiempo de residencia del reactor instalado. Este resultado a escala de laboratorio debe ser rectificado a escala piloto, pues es uno de los parámetros que más afecta el proceso de escalado y por consiguiente la eficiencia del biorreactor piloto.

Para que los resultados sean consecuentes a escala piloto en condiciones ideales como reactor de mezcla perfecta debe utilizarse un volumen efectivo de reacción de 1208 litros. Si se quiere obtener la conversión planificada para 1 m³.

Capítulo III. Propuesta de un sistema experimental piloto para el cultivo de macroalgas marinas con uso de Dióxido de Carbono como nutriente.

De otra forma para un biorreactor de tanque agitado de 1m^3 disponible en este caso responderá a la eficiencia operacional de un biorreactor ideal de $0,832\text{ m}^3$.

Cálculo para el volumen real del reactor a escala piloto para que el volumen efectivo sea 1m^3 .

$$\frac{V_{m1}}{v_1} = 1,208 = \frac{V_{m2}}{V_2} = \frac{1000}{V_2}$$

$$V_2 = 1208$$

*1 representa los datos a escala de laboratorio y 2 los datos de escala piloto.

3.1.1 Análisis preliminar de la aplicación del modelo de flujo.

Considerando una reacción de primer orden sobre la base del consumo de Ortofosfato promedio.

$$\frac{\ddot{C}_A}{C_{AO}} = \frac{v_1}{v} \cdot \left[\frac{1}{1 + K \cdot \ddot{t}_A} \right] + \frac{v_2}{v}$$
$$\frac{\ddot{C}_A}{C_{AO}} = 0,95 \left[\frac{1}{1 + 0,3228 \cdot 10,45} \right] + 0,05$$
$$\frac{\ddot{C}_A}{C_{AO}} = 0,26$$

- Tiempo activo $\ddot{t}_A$

$$\ddot{t}_A = \frac{V_{m1}}{v_1} = 10,45h$$

$$\frac{v_1}{v} = 1 - F\theta; \quad v = v_1 + v_2$$

Donde:

v = flujo real; v_1 = flujo que entra al reactor; V_2 = flujo que se desvía.

K = constante de reacción.

Tabla 3.1 Tabla resumen de C_A experimental y C_A calculada por el Modelo de Clottier y Cholette.

C_{A0} inicial	0,292	1,4	3,63	1,45
C_A experimental	0,07592	0,364	0,9438	377
C_A calculado (Modelo CC)	0,079424	0,238	1,20879	0,609
% de desviación de C_A Calculada con respecto a C_A experimental	-4,615	34,615	-61,538	-28,076

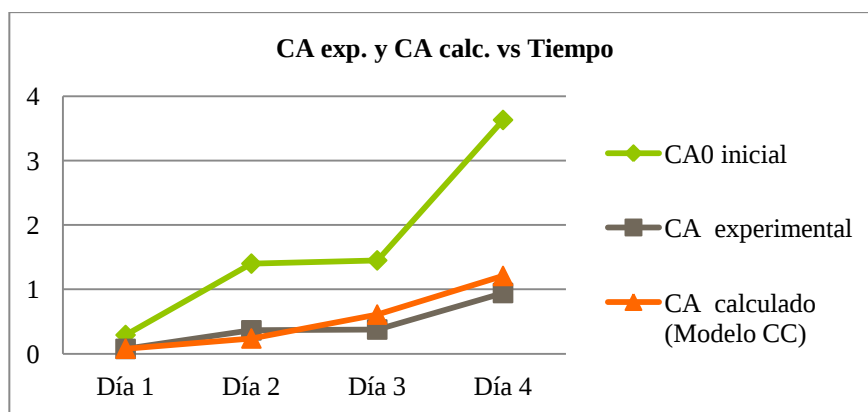


Fig. 3.2 Comportamiento de C_A calculada con respecto a la C_A experimental.

En la Figura 3.2 podemos ver el comportamiento de C_A calculada por el modelo de Clottier y Cholette y C_A experimental donde se observa que las concentraciones mantienen un comportamiento similar.

3.2 Propuesta de un biorreactor para la producción de 1 kg/d de biomasa seca a escala piloto.

Para el escalado del sistema de biorreacción se define una capacidad de producción de 1 kg/d de biomasa seca a escala piloto. A escala de laboratorio se determinó un 10,85 % de biomasa seca; por tanto, para producir 1000 g/d de materia seca, se necesita 9216,58 g de materia húmeda.

- Considerando el modelo flujo ideal (RMP)

Tomando como base 1 día de producción:

$$x \cdot 0,1085 = 1000g$$

$$x = \frac{1000g}{0,1085} = 9216,58g$$

Capítulo III. Propuesta de un sistema experimental piloto para el cultivo de macroalgas marinas con uso de Dióxido de Carbono como nutriente.

En 4 días se obtienen 36866g de biomasa húmeda. La biomasa húmeda inicial según expresión (1) es 11428,46g.

$$X_{nf} = \frac{(CR_0 - CR_f)}{CR_0} \quad (1)$$

Manteniendo el tiempo espacial (τ), la constante de reacción (k) y la altura del biorreactor iguales a los de escala de laboratorio, se definen los parámetros de diseño y operación de sistema de biorreacción a escala piloto.

Determinación de la biomasa húmeda inicial.

$$X_{nf} = \frac{CR_f - CR_0}{CR_f}$$
$$CR_0 = CR_f - (X_{nf} * CR_f)$$
$$CR_0 = 36866g - 0,69 * 36866g)$$
$$CR_0 = 11428,46g$$

Manteniendo el tiempo espacial y la cinética de reacción constantes iguales a los de escala de laboratorio podemos proponer el siguiente sistema de biorreacción.

Datos del biorreactor a escala de laboratorio.

Altura: 20 cm

Largo: 40 cm

Ancho: 19,8 cm

Nivel del líquido: 7,58 cm

Volumen utilizado: 6 l

Flujo de aire: 1 l/min

Flujo de CO₂: 0,0005 l/min

Área superficial: 792 cm²

Área lateral: 906,57 cm²

Área de iluminación total disponible: 1698,57 cm²

Este volumen se utiliza para lograr la mayor penetración de la radiación solar al sistema de Biorreacción, donde:

$$\tau = 12 \text{ h}$$

Capítulo III. Propuesta de un sistema experimental piloto para el cultivo de macroalgas marinas con uso de Dióxido de Carbono como nutriente.

Para alcanzar la misma conversión que se obtuvo a escala de laboratorio en el escalado, tenemos que mantener el mismo tiempo espacial durante toda la corrida.

$$\tau = \frac{V}{q_0}$$

$$q_0 = \frac{V}{\tau} = \frac{1208}{12h} = 100,63 \text{ l/h}$$

Se tiene un flujo de 100,63 l/h

Si mantenemos la misma altura del líquido en el biorreactor a escala piloto igual a la altura del biorreactor utilizado a escala de laboratorio el área del biorreactor propuesto puede ser determinada de la siguiente forma.

Datos:

$$V = 1,208 \text{ m}^3$$

$$H = 0.0757 \text{ m}$$

Fórmula:

$$V = Ar \cdot H$$

$$Ar = \frac{V}{H} = \frac{1,208 \text{ m}^3}{0.0757 \text{ m}} = 15,95 \text{ m}^2$$

El área del reactor es de 15,85 m².

Teniendo en cuenta que el biorreactor de laboratorio tiene una relación de largo y ancho de 2/1 podemos calcular las dimensiones efectivas del biorreactor.

Para un área de 13,21 m².

Largo: 5,64 m

Ancho: 2,82 m

$$V = 1,208 \text{ m}^3$$

$$H = 0,0757 \text{ m}$$

Altura de sobre diseño de 0,04m.

Flujo de aire 160 l/min.

Para que los resultados sean consecuentes en condiciones ideales como reactor de mezcla perfecta debe utilizarse un volumen efectivo de reacción de 1 208 litros.

3.3 Propuesta preliminar de estación experimental piloto.

Para la Planta a escala piloto se utiliza un biorreactor tipo rectangular con agitación (RCCA), el agua de mar es impulsada por una bomba centrífuga hasta el tanque (A) donde se encuentra en medio de cultivo, esta bomba también puede ser utilizada para la recirculación en el caso que se vaya a utilizar, el flujo de agua de entrada y salida del reactor constante, el flujo de entrada es proporcionada por una bomba dosificadora, además se puede utilizar el tanque (B) que se encuentra cerrado herméticamente para que la presión hidrostática sea constante y por lo tanto el volumen se mantiene de igual manera logrando una succión mediante el vacío lo que permite asegurar un flujo estacionario en la operación por gravedad. El sistema de agitación del reactor es proporcionado por la mezcla de aire y CO₂, en aire es expulsado por un compresor a través d un distribuidor de gases, y el CO₂ es suministrado por un balón de CO₂. Además se utilizan válvulas para regular los flujos. El diagrama de flujo se muestra en la Figura 3.2

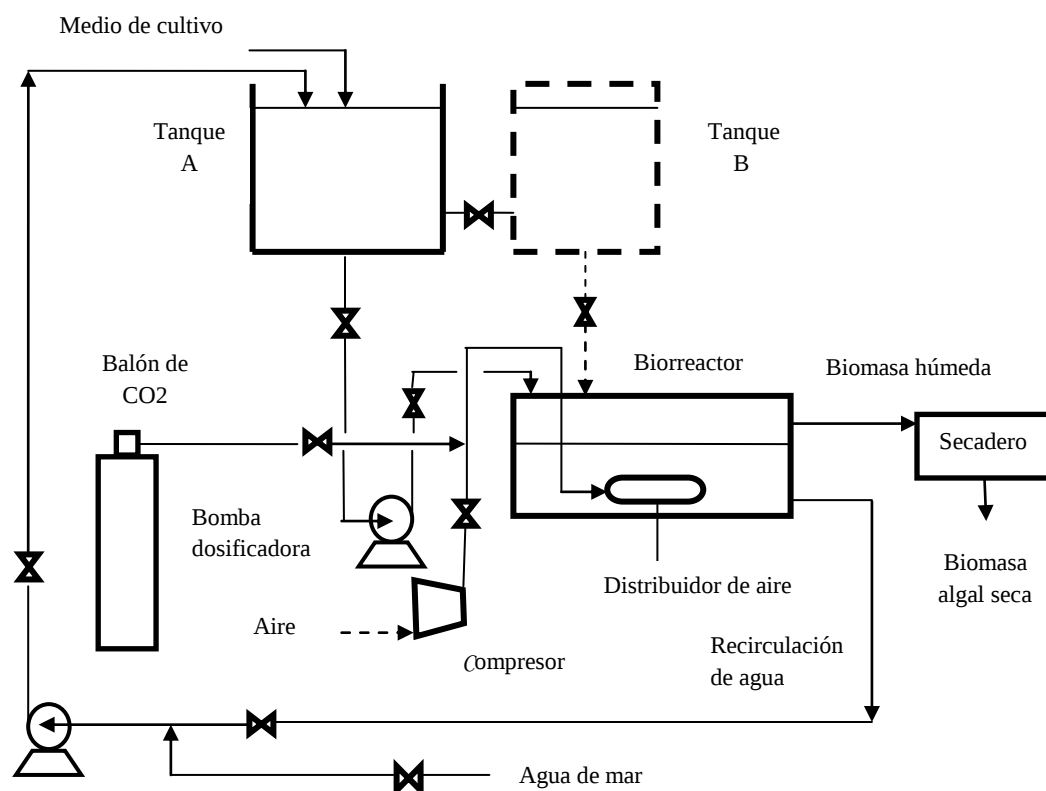


Figura 3.3 Diagrama de flujo de la planta piloto para el cultivo intensivo de algas marinas.

3.4 Evaluación económica preliminar.

La evaluación económica incluye la estimación de costo de inversión, del costo de producción, ganancia y un análisis de la rentabilidad de la inversión, mediante la determinación de los indicadores dinámicos de rentabilidad: Valor Actual Neto, Tasa Interna de Retorno, Período de Recuperación de la Inversión (VAN, TIR, PRD), con el objetivo de proponer el presupuesto para la construcción de una estación piloto de cultivo intensivo de macroalgas marinas con una producción de 1 Kg diario de biomasa algal seca.

3.4.1 Estimación del costo de inversión.

La estimación del costo del equipamiento se realiza tomando la información de los costos de equipamiento de plantas piloto (Drew, 1970), mostrado en la Tabla 3.2. La actualización de los costos de los equipos se realiza mediante el método de escalado del costo, utilizando los índices de costos de Ingeniería Química, conocido por Chemical Engineering Plant Cost Index (CEPCI) para el costo original y actual del equipo respectivamente, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.3.

La estimación del costo de inversión se realiza aplicando el método del por ciento del costo de equipamiento (Peters, 1991), cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.2 Estimación del costo de equipamiento.

No.	Nombre	Capacidad	Especificaciones	Presión de diseño/Temp.	Material	Costo, \$
1	Tanque Mezclador	1 m ³	Abierto, drenaje, agitador lateral	1 atm.	Ac. Inox. 316	850 ¹ (Drew, 1970)
2	Biorreactor	1m ³	Abierto, drenaje, agitación por aire	1 atm	Ac. Inox. 316	450 ¹ (Drew, 1970)
3	Secadero	8 m ²	Atmosférico, aire caliente, instrumentación.	1 atm, 60 °C	Ac. Inox. 316	4000 ¹ (Drew, 1970)
4	Bombas centrifugas (1)	85 L/min	Sello mecánico, motor prueba de explosión, carga 15 m		Ac. Inox. 316	250 ¹ (Drew, 1970)
5	Bomba dosificadora	85L/min	Tipo diafragma TFE	400 lb/pulg ² , 65 °C	Ac. Inox. 316	1000 ¹ (Drew, 1970)
6	Compresor de aire	1kW (10 m ³ /h min)	Centrifugo			1000 ² (Walas, 1960) 1235 ¹
Costo total del equipamiento(I.C. ¹)						7785,00

Índice de Costo Ingeniería Química:

Capítulo III. Propuesta de un sistema experimental piloto para el cultivo de macroalgas marinas con uso de Dióxido de Carbono como nutriente.

$$^1\text{I.C. } 1970 = 125,7$$

$$^2\text{I.C. } 1959 = 101,8$$

$$^3\text{I.C. } 2012 = 596$$

Para estimar la capacidad de compresor de aire se tuvo en cuenta la relación de escalado,

$$\frac{Q_1}{V_1} = \frac{1}{6} = 0,16 = \frac{Q_2}{V_2}$$

$$0,16 * 1000 = Q_2$$

$$Q_2 = 160 \text{ l} / \text{min} = 9,6 \text{ m}^3 / \text{h}$$

Tabla 3.3 Costo actualizado del equipamiento.

No.	Nombre	Costo, \$	Costo actualizado, \$/año
1	Tanque Mezclador	850 ¹ (Drew, 1970)	4029,00
2	Biorreactor	450 ¹ (Drew, 1970)	2133,00
3	Secadero	4000 ¹ (Drew, 1970)	18960,00
4	Bombas centrifugas (1)	250 ¹ (Drew, 1970)	1185,00
5	Bomba dosificadora	1000 ¹ (Drew, 1970)	7740,00
6	Compresor de aire	1000 ² (Walas, 1960) 1235 ¹	5854,00
Costo total del equipamiento(I.C. ³)			39901,00

Capítulo III. Propuesta de un sistema experimental piloto para el cultivo de macroalgas marinas con uso de Dióxido de Carbono como nutriente.

Tabla 3.4 Estimación del costo de inversión basado en el costo del equipamiento (Peters, 1991)

Componente	Por ciento del costo de equipamiento para planta de proceso sólido - fluido	Costo actualizado ³
Equipamiento adquirido	100	36912,00
Instalación del equipamiento adquirido	39	14396,00
Instrumentación y controles	13	4799,00
Tuberías	31	11443,00
Electricidad	10	3691,00
Edificaciones	29	-
Mejoramiento de terreno	10	-
Instalaciones de servicio	55	-
Compra de terreno	6	-
Costo directo total		71241,00
Costos Indirectos		
Ingeniería y supervisión	32	-
Gastos de construcción	34	-
Costos directos e indirectos totales		71241,00
Contratos	18	-
Imprevistos	36	13288,00
Costo fijo de inversión		84529,00

3.4.2 Estimación del costo de producción.

La Tabla 3.6 muestra el resultado de la estimación de los componentes del costo de producción. Los componentes que no se presentan en la tabla, no se calculan, atendiendo a que se asume que no son imprescindibles en la estimación del costo. La materia prima que influye mayormente en el costo son los nutrientes, cuya determinación se muestra en la Tabla 3.5.

La mano de obra se calcula basado en el gasto financiero por concepto de salario medio mensual(\$500,00) de un operador; el servicio principal considerado es el consumo de corriente eléctrica, el cual se determina considerando una potencia instalada de 6 Kw, con la suma de 64 horas de operación de los equipos que consumen corriente, durante 144 días al año; se asume un 2 % del costo de inversión para gastos de mantenimiento y reparaciones; no se obtiene la información actualizada de los gastos de laboratorio, por lo que se asume como un 10 % de la mano de obra; la depreciación se determina con la

Capítulo III. Propuesta de un sistema experimental piloto para el cultivo de macroalgas marinas con uso de Dióxido de Carbono como nutriente.

relación costo de inversión/vida útil, considerando 8 años de vida útil de la estación piloto y los costos de distribución y venta se determinaron considerando que representan un 2 % del costo de producción.

Tabla 3.5 Consumo y costo de los nutrientes para el cultivo de las algas.

Nutrientes	Consumo (kg/Ld ⁻¹)	Costo (CUC/kg)	Costo sin recirculación, CUC/día	Costo, \$/año
NaNO ₃	0,085	57,85	4,9	705,6
PO ₄ HNa ₂ 12H ₂ O	0,0207	55,25	1,14	164,16
Fe(SO ₄) ₂ 7H ₂ O	0,000556	82,55	0.045	6,48
CL ₂ Mn4H ₂ O	0,0000396	84,5	0.0039	0,56
EDTA	0.00744	0,65	0.0052	0,75
CO ₂	6,192	0,4889(CUC+MN)	3	436
Total		281,29	9,99	1439,15

El consumo de CO₂ se estima considerando un factor de escalado de 0,000086; 0,516 m³/h, durante 12 horas/día, en 4 días por semana y durante 36 semanas al año, donde se necesitan 42 balones al año.

Capítulo III. Propuesta de un sistema experimental piloto para el cultivo de macroalgas marinas con uso de Dióxido de Carbono como nutriente.

Tabla 3.6 Estimación del costo total de producción. (Silla, 2003)

Componente	Por ciento	Base	Costo (\$/año)
I. Costo de fabricación = costos directos de producción + costos fijos + costos externos			
A. Costos directos de producción (60% del costo total de producción)			
1. Materias primas	10 - 50%	Costo total de producción	1439,00
2. Mano de obra	10 - 20 %	Costo total de producción	4500,00
3. Supervisión directa	10 -25%	Mano de obra	-
4. Servicios	10 - 20%	Costo total de producción	4608,00
5. Mantenimiento y reparaciones	2 -10%	Inversión fija	1690.00
6. Suministros de operación.	10 - 20%	Costo de mantenimiento y reparaciones	-
7. Costos de laboratorio	10 - 20%	Mano de obra	450,00
8. Patentes	0 - 6%	Costo total de producción	-
B. Costos fijos (10 -20% del costo total de producción)			
1. Depreciación	10 %	Inversión fija en maquinaria y equipo	10566,00
2. Impuestos locales	1 - 4 %	Inversión fija	-
3. Seguros	0,4 - 1%	Inversión fija	-
4. Rentas	8 -12 %	Valor de tierras y edificios rentados	-
C. Costos externos	50 -70%	Costo de mano de obra, supervisión y mantenimiento.	-
II. Gastos generales = costos administrativos + costos de distribución y venta+ investigación y desarrollo			
A. Costos administrativos	15%	Mano de obra, supervisión y mantenimiento	-
B. Costos de distribución y venta	2 – 20 %	Costo total de producción	5047,00
C. Investigación y desarrollo.	2 - 5 %	Costo total de producción	-
D. Interés financiero	0 -10 %	Costo total de inversión	-
III. Costo total de producción = costo de fabricación + gastos generales			28300,00

3.4.3 Análisis de rentabilidad.

En la determinación de los ingresos por venta del producto se supone la venta de productos de alto valor agregado que pueden ser extraídos del alga *Ulva* con rendimientos de 1,35 - 2,3 g/m² día (Figuerola, 2009), y puede tener un contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos alrededor de 15 %, 1,7% y 57 % respectivamente (De Pádua, 2004), utilizados en cosméticos y nutrición (ej. β caroteno), cuyo precio unitario del producto es de \$215,00 –2150,00, donde se toma un promedio de \$1 182,5/kg (Bofill, 2012).

El costo unitario de la biomasa para este análisis es de \$ 385,00/kg, por tanto la relación de costos unitarios cosméticos/biomasa es de 3, es decir el precio unitario del producto de alto

Capítulo III. Propuesta de un sistema experimental piloto para el cultivo de macroalgas marinas con uso de Dióxido de Carbono como nutriente.

valor agregado es 3 veces mayor al precio de la biomasa. De esta forma, para una producción de 144 kg/año de biomasa, se obtiene un ingreso de 55440 \$/año.

Si se considera un 30 % de rendimiento del producto/biomasa para cosméticos de origen algal, a partir de la información de (De Pádua 2004) y 144 kg/año, se obtiene un ingreso de 51084 \$/año.

En la Tabla 3.7 y Figura 3.3 se muestran los resultados del análisis de rentabilidad o factibilidad económica del proyecto, donde se observa que la inversión del proyecto de estación piloto de cultivo de algas se recupera en aproximadamente 5 años, bajo las consideraciones anteriormente expuestas.

Tabla 3.7 Resultados del análisis dinámico de rentabilidad.

VAN	8.165,45
TIR	16%
PRD	5,06

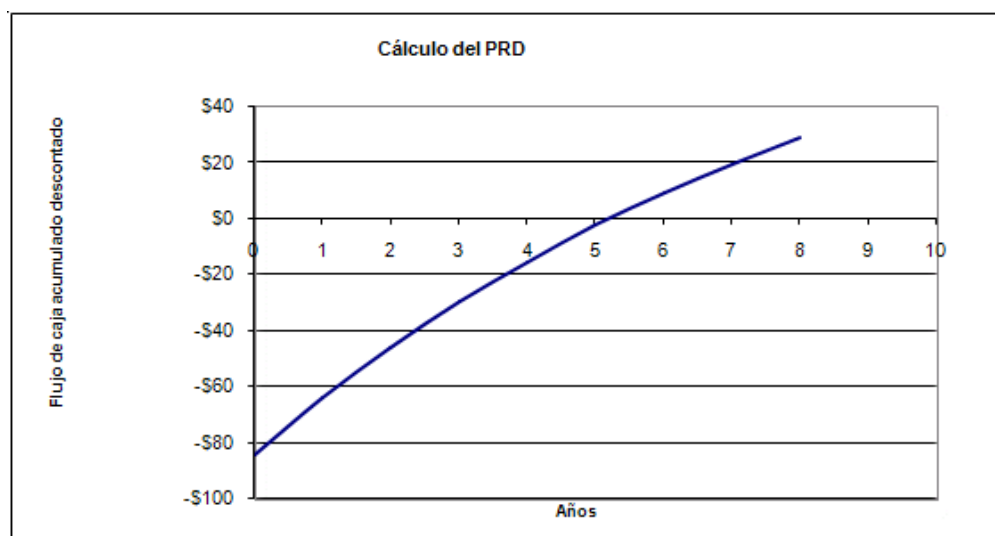


Fig. 3.3 Resultado del tiempo de recuperación de la inversión de la planta piloto del cultivo intensivo de macroalga marina *Ulva Lactuca*.

Conclusiones parciales

1. La evaluación de los defectos de flujo del reactor de laboratorio muestran un comportamiento similar a un reactor de mezcla perfecta con aguas muertas y desvío de flujo, es decir, responde al modelo de flujo de Clottier y Cholette cuyos parámetros son $V_m/V=0,827$ y $v_1/v=0,95$ y un tiempo activo de 10,45 y se corrobora el modelo evaluado para el comportamiento del PO_4^{3-} .
2. Se estimó la factibilidad técnico económica de un proyecto de planta piloto a partir de la información obtenida a nivel experimental, donde se obtiene un estimado de los costos de inversión y de producción con valores de \$84529,00 y 28300,00\$/año respectivamente
3. Como resultado del análisis dinámico de rentabilidad del proyecto de inversión se obtiene un período de recuperación de la inversión de 5 años con valores de VAN y TIR de 8.165,45; 16% respectivamente lo cual indica la viabilidad de su ejecución sobre la base de las consideraciones asumidas en este trabajo siendo la fundamental el empleo de la biomasa como materia prima para la obtención de productos de alto valor agregado (cosméticos).

Conclusiones

1. El estudio bibliográfico realizado evidencia que actualmente en el mundo se investiga intensamente sobre el cultivo intensivo de macroalgas y microalgas utilizando el CO_2 como fuente de carbono lo que contribuye apreciablemente a mitigar la contaminación atmosférica y en consecuencia el denominado Efecto Invernadero. En este sentido en Cuba solo pocos trabajos han estado relacionados en este tema.
2. Se propone un sistema experimental de estudio para el cultivo intensivo de macroalga a escala de laboratorio que incluye el suministro y control del CO_2 como fuente adicional de nutriente por primera vez y a partir de las instalaciones de laboratorio disponibles.
3. Del análisis de los resultados de la evaluación química del comportamiento de la concentración de nutrientes (NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y del Oxígeno Disuelto) se aprecia el desarrollo de la reacción de fotosíntesis y consecuentemente el incremento de la biomasa algal determinada.
4. El estudio experimental realizado da como resultado un apreciable incremento de la biomasa algal superior al 10% cuando se añade 760 ppm CO_2 a la corriente de aireación del biorreactor que se emplea un distribuidor de aire circular.
5. La evaluación de los defectos de flujo del reactor de laboratorio responde al modelo de flujo de CC cuyos parámetros son $V_m/V = 0,827$, $v_1/v = 0,95$ y con $\ddot{t}_A = 10,45$ se corrobora el modelo evaluado para el comportamiento del PO_4^{3-} .
6. En el escalado del sistema experimental de laboratorio a escala piloto, evaluado sobre la base de un análisis dinámico de rentabilidad del proyecto de inversión se obtiene un período de recuperación de la inversión de 5 años con valores de $\text{VAN} = 8.165,45$ y $\text{TIR} = 16\%$ de respectivamente.
7. Los resultados obtenidos en el presente trabajo constituyen una útil fuente de información para la toma de decisiones en la proyección y ejecución de una estación experimental piloto para el cultivo intensivo de macroalgas marinas con el fin de mitigar la contaminación ambiental y la obtención de biomasa como materia prima para diversos fines.

Recomendaciones

1. Realizar los estudios experimentales incluyendo la recirculación del agua de mar con el objetivo de reducir el consumo de nutrientes y prolongar el periodo de crecimiento de las macroalgas.
2. Estudiar diferentes opciones de iluminación a escala experimental para ampliar el periodo de irradiación y la intensidad del proceso de fotosíntesis.
3. Incluir estudios similares con la macroalga tipo *Glacilaria* sp. autóctona de la bahía de Cienfuegos.
4. Incluir estudios con CO₂ de residuales industriales convenientemente purificados.
5. Perfeccionar el sistema de control de suministro y consumo de CO₂ en la estación experimental y la evolución del pH en el biorreactor.

Bibliografía

- Algaelink (2009): "Producción de algas en forma masiva a alta velocidad".
<http://www.buscagro.com/blog/>
- Álvarez Cobelas, M., & Gallardo, T. (1989). Una revisión sobre la biotecnología de las algas.
- Anaerobic digestion of macroalgae: methane potentials, pre-treatment, inhibition and co-digestion. (2011). Recuperado 17 de abril de 2014, a partir de
<http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/22335117/Anaerobic>
- Barsantil, L. & Guarltieri, P.(2006). Algae: Anatomy, biochemistry and biotechnology. CRC Press.
- Basaure, P. (2011, agosto 3). Alga Ulva lactuca/composta y biogás.
- Boffill, Y.(2012). Reducción de emisiones industriales de dióxido de carbono mediante la producción de biomasa microalgal, Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Ingeniería de Procesos Biotecnológicos.
- Boyd, C. E. (s.f.). Consideraciones sobre la calidad del agua y del suelo en cultivos de camarón.
- Briggs, M. (2004). Widescale Biodiesel Production from Algae. University of New Hampshire, Physics Department. http://www.unh.edu/p2/biodiesel/article_alge.html
- Cano Mallo, M. de la C. (2008). Bases biológicas de ulva fasciata delile, (chlorophyta) para su posible explotación, al oeste de la habana, cuba
-
- Clayton, M. (2006): “algas que funcionan como pastillas para el aliento en las chimeneas”, The Christian Science Monitor, 11de enero.
http://www.astroseti.org/noticia_1826_granjas_algas_junto_las_centrales_electricas.htm?nobar=1
- Colectivo de autores. (2009, febrero). A Review of the Potential of Marine Algae as a Source of Biofuel in Ireland. Recuperado a partir de
http://www.seai.ie/Publications/Renewables_Publications_/Bioenergy/Algaereport.pdf
- Colectivo de autores. (2010). Energía de la algas presente y futuro.
- Colectivo de autores. (2011). Energy Production from Marine Biomass (Ulva lactuca). Recuperado a partir de www.algecenterdanmark.dk

- Colectivo de autores. (2012, noviembre 22). Challenges in micro and macroalgae cultivation in the Baltic Sea Region. Recuperado a partir de http://www.baltic.org/files/2380/SUBMARINER_ScanBalt_2012_Seppala.pdf
- Colectivo de autores. (2012a, mayo). Danish State-of-Art on Micro and Macro Algae. Recuperado a partir de http://www.nordicinnovation.org/Documents/Attachments/NordicAlgaeNetwork_MarineProject/NIC%20DK%20report%20Iceland%20150512.pdf
- Colectivo de autores. (2013a). Biofuel Production in Ireland—An Approach to 2020 Targets with a Focus on Algal Biomass. Recuperado a partir de www.mdpi.com/journal/energies
- Colectivo de - -
- Colectivo de autores. (2013c, julio 5). Fast Detection of Nutrient Limitation in Macroalgae and Seagrass with Nutrient-Induced Fluorescence. Recuperado 17 de abril de 2014, a partir de <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0068834>
- Colectivo de autores. (s. f.). Capture of CO₂ Emissions Using Algae. Recuperado a partir de http://www.oilgae.com/ref/downloads/Analysis_of_CO2_Capture_Using_Algae.pdf
- De Alencar, J. R., Horta Junior, P. A., & Celino, J. J. (2010). Cultivo de Camarão Branco *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) com a Macro-alga *Ulva Lacuata* Linneaus (Chlorophyta) no Tratamento de Efluentes em Sistema Fechado de Recirculação 10(2). Recuperado a partir de <http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/alencar.pdf>
- De Pádua, M., Growoski Fontoura, P. S., & Mathias, A. L. (2004). Chemical Composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile), 47(1), 49-55. <http://www.scielo.br/pdf/babt/v47n1/20488.pdf>
- Drew, J. (1970). How to Estimate Cost of Pilot – Plant Equipment, Chemical Engineering pp. 100 - 110 <http://www.scielo.br/pdf/babt/v47n1/20488.pdf>
- Edding, M., Tala, F., & Vásquez, J. (2006). Fotosíntesis, productividad y algas marinas. Recuperado a partir de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/fotosintesisyproductividadyalgasmarinas.pdf>
- Fernández Avilés., Y. (2012). Estudio del cultivo intensivo de macroalgas marinas en un biorreactor de tanque agitado a escala de laboratorio. Universidad Central de las Villas, Marta Abreus.
- Figuerola, Félix et al. (2009). Effects of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation in *Ulva lactuca* (Chlorophyta): responses to short-term stress. *Aquatic Biology*, Vol. 7: 173–183

- Gao, K. & K. McKinley. (1993). Use of macroalgae for marine biomass production and CO₂ remediation: a review. *Journal of Applied Phycology* 6(1): 45-60.
- Gao, K., Aruga, Y., Asada, K. and Kiyohara, M. (1993). Influence of enhanced CO₂ on growth and photosynthesis of the red algae *Gracilaria* sp. and *G. chilensis*. *Journal of Applied Phycology* 5: 563-571.
- Gómez Hermoso, F. (2009, diciembre 18). Breras a la producción de algas con fines energéticos. Recuperado a partir de http://www.madrimasd.org/blogs/renovables_medioambiente/2009/12/18/130278
- Gómez, J. L. (2012). Posibilidades para el desarrollo de sistemas integrados con macroalgas en las Islas Canarias y su entorno. Centro de Biotecnología Marina.
- Harwich Sea Lettuce Control Project. (2008). Recuperado 17 de abril de 2014, a partir de <http://threeharbors.com/sealettucecontrol.html>
- Horn S., I. Aasen, K. Østgaard. (2000). Ethanol production from seaweed extract. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25(5): 249-254
- Ibáñez, M. E. (2009, enero). Challenges and options in the extraction of bioactive compounds from macro-algae. Recuperado a partir de <http://www.marine.ie/NR/rdonlyres/11573BAD-8601-40E4-BC8E-CB4A2337534B/0/DrIbanezspresentation.pdf>
- Kubler, J.E., Johnston, A.M. and Raven, J.A. (1999). The effects of reduced and elevated CO₂ and O₂ on the seaweed *Lomentaria articulata*. *Plant, Cell and Environment* 22: 1303-1310.
- Levenspiel, O. (1985). Ingeniería de las Reacciones Químicas.
- Msuya, F. E., & Neori, A. (2002). *Ulva reticulata* and *Gracilaria crassa*: Macroalgae That Can Biofilter Effluent from Tidal Fishponds in Tanzania. 1(2), 117-126.
- Optimization and kinetic studies on algal oil extraction from marine macroalgae *Ulva lactuca*. (s. f.). Recuperado 17 de abril de 2014, a partir de <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.elsevier-ffb68c53-b2bd-3c8a-929f-520079745921>
- Peters, M.. (1991). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*, McGraw-Hill Book Co. 923 p.
- Raposa, K. B., Russell, B., & Bertrand, A. (2011, noviembre). A protocol for rapidly monitoring macroalgae in the Narragansett Bay Research Reserve. Recuperado a partir de http://www.nbner.org/Content/techseries_2011_4_withcover.pdf

- Reith, J., E. Deurwaarder, K. Hermes, P. Kamermans, W. Brandenburg & G. Zeeman. (2005). Bio-Offshore. Grootschalige teelt van zeewieren in combinatie met offshore windparken in de Noordzee. ECN Biomassa, A.P.W.M. Curvers, ECN Windenergie, WUR - Nederlands Instituut voor Visserijonderzoek / RIVO, Plant Research International, Lettinga Associates Foundation. Holanda. 137 p. <http://www.ecn.nl/docs/library/report/2005/c05008.pdf>
- Risen, E., & Gröndahl, F. (2011). *Assessment of macroalgae harvesting from the baltic sea from an energy balance perspective*. Recuperado a partir de <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:579473/FULLTEXT01.pdf>
- Robertson-Andersson, D. V., Bolton, Shuuluka, & Kandjengo. (2008). Growing Ulva (Chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South Africa: a SWOT analysis.
- Robledo Ramírez, D. (1993). Cultivo, adaptación morfológica y fisiopatología de macroalgas marinas de interés industrial.
- Robledo, D. (2012, abril 15). LAS ALGAS Y
- Romagnoli, F. (2010). Biogas from Marine Macroalgae: a New Environmental Technology – Life Cycle Inventory for a Further LCA. 4. Recuperado a partir de <https://ortus.rtu.lv/science>
- Runcie, J. W., Ritchie, R. J., & Larkum, A. W. D. (2003). Uptake kinetics and assimilation of inorganic nitrogen by *Catenella nipae* and *Ulva lactuca*.
- Ryther, J. H., DeBusk, T. A., & Blakeslee, M. (1984). Cultivation and Conversion of Marine Macroalgae. Harbor Branch Institution Fort Pierce, Florida. Recuperado a partir de <http://www.nrel.gov/docs/legosti/old/2360.pdf>
- Silla, H.. (2003). Chemical Process Engineering Design and Economics, Marcel Dekker, Inc. 483 p.
- Sinha, V. R..., & Fraley, L. (2006). Carbon dioxide utilization and seaweed production. Recuperado a partir de http://www.netl.doe.gov/publications/proceedings/01/carbon_seq/p14.pdf
- Sitompul, J. P., Bayu, A., Soerawidjaja, T. H., & Lee, H. W. (2013). Sea plant anaerobic biomass biodegradation and biogas production in the mini-pilot digester. 11(4). Recuperado a partir de <http://jtki.aptekindo.org/index.php/jtki/article/view/232>
- Suetsuna, K. (1998). Separation and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from peptic digest of *Hizikia fusiformis* protein. *Nippon Suisan Gakkaishi* **64**: 862-866.
- Viera Toledo, M. del P., Palacios Barber, H. F., & Courtois de Viçose, G. (2011). Acuicultura integrada: experiencia piloto para el desarrollo de cultivos multitróficos. Recuperado a partir de

http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/planes_nacionales/Documentos/101_IF_MULTITR_OFICOS_anexo_Canarias.pdf

- Villares, R., Puente, X., & Carballeira, A. (1998). Nitrogen and phosphorus in *Ulva* sp. in the Galician Rias Bajas (northwest Spain): Seasonal fluctuations and influence on growth.
- Walas, S. (1960). Nomograph Updates Process Equipment Costs, Chemical Engineering Mar. 21, pp. 173-174
- Winberg, P., Ghosh, D., & Tapsell, L. (2009, enero). Seaweed Culture in Integrated Multi-Trophic Aquaculture: Nutritional Benefits and Systems for Australia. Recuperado a partir de <http://ro.uow.edu.au/cgi/viewcontent.cgi?article=1004&context=smfc>
- Xu, Z., Zou, D., & Gao, K. (2010). Effects of elevated CO₂ and phosphorus supply on growth, photosynthesis and nutrient uptake in the marine macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta).
- Zou, D. (2005). Effects of elevated atmospheric CO₂ on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in the economic brown seaweed, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyta). *Aquaculture* **250**: 726-735

Anexos

Anexos

Anexo 1: Determinación de los defectos de flujos en el biorreactor a escala piloto.

Tiempo (h)	Δt_i	Salinidad	1/Ci	$C_i \cdot t_i \cdot \Delta t_i$	$C_i \cdot \Delta t_i$	tiempo medio	$\theta = t_i / t_m$	$F = F_0 = C_i / C_0$	C0 inicial	1 - F0
0	0,5	38	0,02631579	0	0,01315789	17,6544784	0	0,05263158	0,5	0,94736842
0,5	0,5	37,9	0,02638522	0,00659631	0,01319261	17,6544784	0,02832143	0,05277045	0,5	0,94722955
1	0,5	37,8	0,02645503	0,01322751	0,01322751	17,6544784	0,05664285	0,05291005	0,5	0,94708995
1,5	0,5	37,7	0,0265252	0,0198939	0,0132626	17,6544784	0,08496428	0,0530504	0,5	0,9469496
2	0,5	37,6	0,02659574	0,02659574	0,01329787	17,6544784	0,1132857	0,05319149	0,5	0,94680851
2,5	0,5	37,5	0,02666667	0,03333333	0,01333333	17,6544784	0,14160713	0,05333333	0,5	0,94666667
3	0,5	37,4	0,02673797	0,04010695	0,01336898	17,6544784	0,16992856	0,05347594	0,5	0,94652406
3,5	0,5	37,3	0,02680965	0,04691689	0,01340483	17,6544784	0,19824998	0,0536193	0,5	0,9463807
4	0,5	37,2	0,02688172	0,05376344	0,01344086	17,6544784	0,22657141	0,05376344	0,5	0,94623656
4,5	0,5	37,1	0,02695418	0,0606469	0,01347709	17,6544784	0,25489283	0,05390836	0,5	0,94609164
5	0,5	37	0,02702703	0,06756757	0,01351351	17,6544784	0,28321426	0,05405405	0,5	0,94594595
5,5	0,5	36,9	0,02710027	0,07452575	0,01355014	17,6544784	0,31153568	0,05420054	0,5	0,94579946
6	0,5	36,8	0,02717391	0,08152174	0,01358696	17,6544784	0,33985711	0,05434783	0,5	0,94565217
6,5	0,5	36,7	0,02724796	0,08855586	0,01362398	17,6544784	0,36817854	0,05449591	0,5	0,94550409
7	0,5	36,6	0,0273224	0,09562842	0,0136612	17,6544784	0,39649996	0,05464481	0,5	0,94535519
7,5	0,5	36,5	0,02739726	0,10273973	0,01369863	17,6544784	0,42482139	0,05479452	0,5	0,94520548
8	0,5	35	0,02857143	0,11428571	0,01428571	17,6544784	0,45314281	0,05714286	0,5	0,94285714
8,5	0,5	34,3	0,02915452	0,12390671	0,01457726	17,6544784	0,48146424	0,05830904	0,5	0,94169096
9	0,5	33,9	0,02949853	0,13274336	0,01474926	17,6544784	0,50978567	0,05899705	0,5	0,94100295
9,5	0,5	32,9	0,03039514	0,1443769	0,01519757	17,6544784	0,53810709	0,06079027	0,5	0,93920973
10	0,5	32,2	0,0310559	0,1552795	0,01552795	17,6544784	0,56642852	0,0621118	0,5	0,9378882
10,5	0,5	31	0,03225806	0,16935484	0,01612903	17,6544784	0,59474994	0,06451613	0,5	0,93548387
11	0,5	28,2	0,03546099	0,19503546	0,0177305	17,6544784	0,62307137	0,07092199	0,5	0,92907801
11,5	0,5	27,1	0,03690037	0,21217712	0,01845018	17,6544784	0,6513928	0,07380074	0,5	0,92619926
12	0,5	26,4	0,03787879	0,22727273	0,01893939	17,6544784	0,67971422	0,07575758	0,5	0,92424242
12,5	0,5	25,9	0,03861004	0,24131274	0,01930502	17,6544784	0,70803565	0,07722008	0,5	0,92277992
13	0,5	24,9	0,04016064	0,26104418	0,02008032	17,6544784	0,73635707	0,08032129	0,5	0,91967871
13,5	0,5	23,8	0,04201681	0,28361345	0,0210084	17,6544784	0,7646785	0,08403361	0,5	0,91596639
14	0,5	22,6	0,04424779	0,30973451	0,02212389	17,6544784	0,79299992	0,08849558	0,5	0,91150442
14,5	0,5	21	0,04761905	0,3452381	0,02380952	17,6544784	0,82132135	0,0952381	0,5	0,9047619
15	0,5	19	0,05263158	0,39473684	0,02631579	17,6544784	0,84964278	0,10526316	0,5	0,89473684
15,5	0,5	18,2	0,05494505	0,42582418	0,02747253	17,6544784	0,8779642	0,10989011	0,5	0,89010989
16	0,5	17,4	0,05747126	0,45977011	0,02873563	17,6544784	0,90628563	0,11494253	0,5	0,88505747
16,5	0,5	16,3	0,06134969	0,50613497	0,03067485	17,6544784	0,93460705	0,12269939	0,5	0,87730061
17	0,5	15,5	0,06451613	0,5483871	0,03225806	17,6544784	0,96292848	0,12903226	0,5	0,87096774
17,5	0,5	14,2	0,07042254	0,61619718	0,03521127	17,6544784	0,99124991	0,14084507	0,5	0,85915493

Anexos

18	0,5	13	0,07692308	0,69230769	0,03846154	17,6544784	1,01957133	0,15384615	0,5	0,84615385
18,5	0,5	12,7	0,07874016	0,72834646	0,03937008	17,6544784	1,04789276	0,15748031	0,5	0,84251969
19	0,5	11,8	0,08474576	0,80508475	0,04237288	17,6544784	1,07621418	0,16949153	0,5	0,83050847
19,5	0,5	10,2	0,09803922	0,95588235	0,04901961	17,6544784	1,10453561	0,19607843	0,5	0,80392157
20	0,5	9,4	0,10638298	1,06382979	0,05319149	17,6544784	1,13285703	0,21276596	0,5	0,78723404
20,5	0,5	8,3	0,12048193	1,23493976	0,06024096	17,6544784	1,16117846	0,24096386	0,5	0,75903614
21	0,5	7,1	0,14084507	1,47887324	0,07042254	17,6544784	1,18949989	0,28169014	0,5	0,71830986
21,5	0,5	6,8	0,14705882	1,58088235	0,07352941	17,6544784	1,21782131	0,29411765	0,5	0,70588235
22	0,5	5,4	0,18518519	2,03703704	0,09259259	17,6544784	1,24614274	0,37037037	0,5	0,62962963
22,5	0,5	4,7	0,21276596	2,39361702	0,10638298	17,6544784	1,27446416	0,42553191	0,5	0,57446809
23	0,5	3,9	0,25641026	2,94871795	0,12820513	17,6544784	1,30278559	0,51282051	0,5	0,48717949
23,5	0,5	3	0,33333333	3,91666667	0,16666667	17,6544784	1,33110702	0,66666667	0,5	0,33333333
24	0,5	2,7	0,37037037	4,44444444	0,18518519	17,6544784	1,35942844	0,74074074	0,5	0,25925926

Anexo 2: Costo de inversión

Concepto	Costo (\$)
Equipamiento adquirido	36912
Instalación del equipamiento adquirido	14396
Instrumentación y controles	4799
Tuberías	11443
Electricidad	3691
Edificaciones	
Mejoramiento de terreno	
Instalaciones de servicio	
Compra de terreno	
Ingeniería y supervisión	
Gastos de construcción	
Contratos	
Imprevistos	13288
Costo total de inversión	84529,00

[illegible]

Anexo 5: VAN TIR

Concepto	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ingresos por venta		51.084,00	51.084,00	51.084,00	51.084,00	51.084,00	51.084,00	51.084,00	51.084,00	
Costos de producción		28.300,00	28.300,00	28.300,00	28.300,00	28.300,00	28.300,00	28.300,00	28.300,00	
Beneficios		22.784,00	22.784,00	22.784,00	22.784,00	22.784,00	22.784,00	22.784,00	22.784,00	
Depreciación		10.566,13	10.566,13	10.566,13	10.566,13	10.566,13	10.566,13	10.566,13	10.566,13	
Beneficios antes del impuesto		12.217,88	12.217,88	12.217,88	12.217,88	12.217,88	12.217,88	12.217,88	12.217,88	
Impuestos										
Beneficios después de impuesto		12.217,88	12.217,88	12.217,88	12.217,88	12.217,88	12.217,88	12.217,88	12.217,88	
Costo de inversión	84.529,00									
Pago de deudas		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	2,00	
Flujo de caja	- 84.529,00	22.784,00	22.784,00	22.784,00	22.784,00	22.784,00	22.784,00	22.784,00	22.784,00	182.269,00
Flujo de caja actualizado	- 84.529,00	20.342,86	18.163,27	16.217,20	14.479,64	12.928,25	11.543,08	10.305,87	9.201,27	
Flujo de caja al descontado	- 84.529,00	- 64.186,14	- 46.022,88	- 29.805,68	- 15.326,03	- 2.397,78	- 9.145,30	- 19.451,18	- 28.652,44	

Anexo 7: MANUAL DE INSTRUCCIONES Y PROCEDIMIENTOS CENTRO DE ESTUDIOS AMBIENTALES DE CIENFUEGOS.

• DETERMINACIÓN DE PH.

El valor de pH es usado en mediciones de alcalinidad y dióxido de carbono y muchos otros equilibrios ácido-base. Usualmente las aguas naturales tienen un pH de 4 a 9 y la ligera acidez presente en la mayoría de los casos se debe a la presencia de bicarbonatos y carbonatos de metales alcalinos térreos.

El principio básico del método es la determinación de la actividad de los iones H^+ mediante mediciones potencio-métricas, basadas en la ecuación de Nernst.

Procedimiento.

Realice una calibración intermedia del pH-metro:

- Cuando sustituya el electrodo de pH o la sonda de temperatura.
- Al menos una vez al mes.
- Después de analizar productos químicos agresivos.
- Se requiere de una gran precisión.
- Cuando sustituya las pilas.

Para medir el pH de la muestra a analizar retire el capuchón de protección del electrodo (el cual debe de ser enjuagado con la muestra a analizar) y simplemente sumerja su punta (4 cm / 1 1/2") y la sonda de temperatura en la muestra a analizar.

Para encender el instrumento HANNA, mantenga pulsada la tecla ON/OFF durante una fracción de segundo o encienda el instrumento WTW; Multi 340 y presionando la tecla  y siga las instrucciones del manual de operaciones del equipo.

Permita que el electrodo se adapte a la solución y se estabilice antes de tomar la lectura de pH.

Si la temperatura de la muestra es muy diferente de la temperatura a la cual se ha mantenido el electrodo, espere unos minutos para conseguir un perfecto equilibrio térmico entre ellos.

Cuando termine la medición apague el equipo, enjuague el electrodo y la sonda de temperatura con agua destilada. Guarde el electrodo de pH en su capuchón de protección.

Cálculo, incertidumbre y expresión de los resultados.

La incertidumbre en la determinación de pH es calculada de acuerdo a como se describe en Informe del Cálculo de Incertidumbre de la determinación del pH en agua.

Cálculo de la Incertidumbre expandida:

$$U_{(pH)} = K * pH * 0,0040$$

Donde:

K: Coeficiente de cobertura (2,1 para un 95% de confianza).

0,0040: Incertidumbre estándar combinada relativa.

Quedando:

$$U_{(pH)} = 2,1 * pH * 0,0040$$

$$U_{(pH)} = pH * 0,0080$$

Donde:

pH: valor de pH medido por el equipo.

Nota: El valor de la incertidumbre se reportará con dos lugares después de la coma aplicando adecuadamente las reglas de redondeo.

Expresión del resultado de pH:

Expresa los resultados directamente como unidades de pH de la siguiente forma:

$$pH = pH \pm U(pH)$$

Aparatos, utensilios y medios de medición empleados:

- 1-. Sonda multiparamétrica WTW
- 2-. Útiles y cristalería de laboratorio.

• PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALINIDAD Y/O CONDUCTIVIDAD EN AGUA.

Muestreo y conservación

Los frascos de muestreo deben estar limpios y secos. El ensayo debe hacerse inmediatamente después de recolectada la muestra o llevarse a cabo in-situ.

Determinación de la salinidad.

La determinación de la salinidad se basa en el uso de métodos indirectos que parten de la medición de una propiedad física, que usualmente es la conductividad por ser ésta la de

mayor precisión. La esencia del método radica en un cálculo hecho por la electrónica del instrumento, basado en la lectura de la conductividad y la temperatura, a partir de las cuales depende el valor de salinidad.

Calibración y comprobación del equipo.

Para realizar una comprobación rutinaria del equipo se toma en un beaker una porción de agua de mar sintética. Sumerja en la misma la sonda de medición de modo tal que la solución cubra completamente el orificio de la sonda. Lea el valor de salinidad reportado y compruebe su aptitud utilizando el gráfico de control diseñado para este equipo según procedimiento L-SA-006

Procedimiento

La medición de la salinidad y/o conductividad de la muestra se realiza de acuerdo al manual de operaciones del salinómetro.

Luego de la medición, lave el sistema de electrodos con pequeñas cantidades de agua destilada y seque con papel de filtro (esta operación debe realizarse luego de cada medición).

Incertidumbre y expresión de los resultados

Primeramente se calcula la incertidumbre combinada teniendo en cuenta las incertidumbres de los componentes individuales (C.V) de la veracidad y de la precisión. Se utiliza la siguiente fórmula:

$$u_{\text{combinada}} = \sqrt{C.V^2 \text{ precisión (reproducción)} + C.V^2 \text{ veracidad (exactitud)}}$$

Donde:

C.V = Coeficientes de Variación calculados.

Para reportar la incertidumbre expandida de cada rango y modo de medición (conductividad y salinidad) se toma la siguiente fórmula:

$$u_{\text{exp}} = C * u_{\text{combinada}} * k$$

donde:

$u_{\text{combinada}}$ = Incertidumbre combinada relativa.

C = Conductividad (o salinidad) medida en el equipo.

k = Coeficiente de cobertura para un 95% de confianza y n-1 grados de libertad.

Para el cálculo de la incertidumbre expandida (para los distintos rangos y modos de medición) se creó una hoja de cálculo Excel la cual está ubicada en la P.C del local de Ensayos Físico-Químicos de las aguas y Atmósfera. Dicha hoja está confeccionada en base a la fórmula descrita en el punto anterior.

Los resultados se expresan de la siguiente forma:

Salinidad (S) $\pm u_{\text{exp}}$ (ppt)

Conductividad (C) $\pm u_{\text{exp}}$ ($\mu\text{S}/\text{cm}$)

Donde:

u_{exp} : Incertidumbre expandida (según hoja de cálculo).

S: Salinidad (ppt) del analito a determinar ó C: Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) del analito a determinar.

Aparatos, utensilios y medios de medición empleados:

- 1-. Salinómetro digital (sonda YSI-30).
- 2-. Útiles y cristalería de laboratorio.

• PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE OXÍGENO DISUELTO EN AGUA

El oxígeno disuelto, es un gas necesario en cantidades adecuadas para la vida de los organismos acuáticos. La concentración de oxígeno en las aguas puede relacionarse con la corrosividad de las aguas, con la actividad fotosintética y con su esterilidad.

La muestra se trata con sulfato manganoso, hidróxido de sodio, yoduro de sodio, acida sódica y finalmente con ácido sulfúrico. El precipitado inicial de hidróxido manganoso $\text{Mn}(\text{OH})_2$, se combina con el oxígeno disuelto de la muestra para formar un precipitado carmelita de hidróxido mangánico $\text{MnO}(\text{OH})_2$. La acidificación de la muestra con ácido sulfúrico forma sulfato mangánico, el cual actúa como un agente oxidante liberando iodo del yoduro de potasio. El yodo liberado, es estequiométricamente equivalente al oxígeno disuelto de la muestra y es valorado con tiosulfato de sodio.

Muestreo y muestras

Las muestras para el análisis de O.D., deben ser las primeras en colectarse. Estas deben ser extraídas del recipiente de muestreo cuidadosamente, sifoneando con un tubo de goma. El tubo se introduce en la botella para DBO y se va extrayendo mientras la botella se llena,

permitiendo que se derrame un volumen igual de muestra para evitar burbujas. Inmediatamente tape la botella y manténgala en lugares oscuros y frescos hasta su fijación con los reactivos para determinar oxígeno. La fijación de la muestra debe ser lo más pronto posible, después de su obtención (preferentemente antes de las 6 horas).

Determinación del oxígeno disuelto

Primeramente se le determina el volumen hasta el borde a las botellas para DBO. Recolecte la muestra de agua en la botella cuidando que no queden burbujas de aire en el mismo. Para lograr esto, tome la muestra introduciendo una manguera fina hasta el fondo del recipiente y sáquela poco a poco cuando la botella se llene completamente. A la muestra colectada, agréguele con pipetas tipo jeringuilla 1 mL de solución de sulfato manganoso y 1 ml de solución de yoduro alcalino-azida; trate que la punta de la pipeta quede lo más cerca posible del fondo de la botella. Tape la misma cuidadosamente de manera tal que no queden burbujas de aire. Agite vigorosamente invirtiendo la botella por lo menos 10 veces, tomándolo por la parte superior y después deje reposar la suspensión hasta que el precipitado alcance por lo menos 3/4 del volumen de la botella. Retire la tapa de la botella y añada con una pipeta fina (introduciéndola hasta el fondo de la botella) 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Agite hasta la disolución del precipitado. Vierta la muestra en un erlenmeyer de 500 mL y valore al yodo liberado, con solución valorada de tiosulfato de sodio hasta que alcance un color amarillo pálido, adicionar 1-2 mL de solución de almidón y continúe valorando hasta la desaparición total del color azul.

Incertidumbre y expresión de los resultados

Se calcula la incertidumbre expandida de la siguiente forma:

$$u_{exp} = S.D * 2$$

Donde:

u_{exp} = Incertidumbre expandida.

S.D= Desviación estándar reportada por el método (según referencia 3.1) que en este caso es de 0,06 mg/L.

2 = Factor de cobertura (K) para un 95% de confianza.

Finalmente, la incertidumbre expandida para este método es de:

$$u_{exp} = 0,12 \text{ mg/L}$$

Expresión de los resultados

La concentración de oxígeno disuelto se determina por la fórmula siguiente:

$$O.D.(mg/L) = \frac{Nt \times Vt \times 8000}{(V - 2)}$$

donde:

Vt: Volumen de la disolución de tiosulfato consumido en la valoración del yodo liberado,

Nt: Es la normalidad del tiosulfato.

8000: Es el equivalente gramo del oxígeno (8) multiplicado por 1000 para expresar el resultado en mg/L.

(V-2): Es el volumen de muestra realmente analizada, el 2 indica el volumen de muestra perdida por la adición del sulfato manganoso y del yoduro alcalino-azida.

Los resultados se expresan de la siguiente forma:

$$O.D \pm 0,12 \text{ (mg/L)}$$

Donde:

O.D: Concentración de oxígeno disuelto en la muestra

0,12: Incertidumbre expandida

Reactivos utilizados en el ensayo

1- Solución de sulfato manganoso: Disuelva 120 g de sulfato manganoso, $MnSO_4 \times 4H_2O$ (p.a), en agua destilada y diluya en un volumétrico hasta 250 mL.

2- Reactivo de yoduro alcalino-azida:

Disuelva 33,75 g de NaI (p.a) en el menor volumen de agua destilada posible hasta la total dilución.

Disuelva 125 g de NaOH (p.a) en la menor cantidad de agua destilada posible hasta la total dilución y luego deje enfriar.

Disuelva 2,5 g de azida sódica (NaN_3) (p.a) en el menor volumen de agua posible.

Estas tres soluciones se mezclan en un volumétrico de 250 mL y se enrasa hasta la marca con agua destilada. Esta solución se almacena en un frasco plástico. Si se forman cristales debido a la alta concentración, la solución se decanta para otro recipiente.

3- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) (p.a).

4- Disolución de almidón (1%): disuelva 1 g de almidón soluble en una pequeña cantidad de agua destilada caliente. Se transfiere a un volumétrico de 100 mL y se enrasa hasta la marca. Conserve en refrigerador y es estable por una semana.

5- Solución de tiosulfato de sodio (0,025N). Se disuelven 6,205 g de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$) (p.a) en agua destilada recién hervida y enfriada, y se diluye a 1 L. Esta solución debe ser preservada con la adición de 5 mL de cloroformo por litro y se almacena en botella ámbar. Esta solución debe ser valorada con solución estándar de bi-yodato de potasio (p.a) 0,0021 M; o solución estándar de yodato de potasio (p.a) 0,02N.

6- Solución estándar de bi-yodato de potasio (0,0021 M): Disuelva 0,8124 g de $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ (p.a) en agua destilada y enrase a 1000 mL.

7- Solución de yodato de potasio (0,02 N): Se disuelven 0,7133 g de KIO_3 (p.a), previamente secado a 140 °C en agua destilada y se diluye a un litro.

Estandarización de la solución de tiosulfato de sodio.

Utilizando el bi-yodato de potasio 0,0021M.

1- Disuelva aproximadamente 2 gramos de KI (p.a) en un frasco erlenmeyer en 100 ó 150 mL de agua destilada.

2- Adicione 1 mL de H_2SO_4 6N o unas gotas de H_2SO_4 concentrado (p.a) y 20,00 mL de solución estándar de bi-yodato de potasio.

3- Diluya hasta 200 mL con agua destilada y valore el yodo liberado con la solución de tiosulfato de sodio, adicionando almidón antes del pinto final de la valoración (se observa un pálido color amarillo).

4- Para una solución 0,025 N de tiosulfato de sodio se requieren consumir 20 mL de la misma en la valoración. De no consumir 20 mL calcule la concentración de la siguiente manera:

$$\text{Conc. real del tiosulfato (N)} = \frac{\text{mL consumidos en valoración}}{20} \times 0,025$$

Utilizando el yodato de potasio 0,02N.

1- Se llenan 2 recipientes con tapa esmerilada con agua destilada y se añaden, agitando y tapando cada vez, 1 mL de H_2SO_4 1:1; 1 mL de solución de sulfato manganoso (solución A) y 1 mL de disolución de yoduro alcalino-azida (solución B).

2- La mezcla se vierte en un erlenmeyer de 500 mL y se añade con una pipeta, 20 mL de solución de yodato de potasio, se agita y se guarda en la oscuridad de 2 a 4 min.

3- El yodo liberado se valora con solución de tiosulfato de sodio hasta un color paja pálido, se agregan 1-2 ml de solución de almidón y se continúa la valoración hasta la desaparición del color azul.

Nota: Si la solución se torna amarilla antes de añadir el yodato significa que algunos de los reactivos están oxidados y debe añadirse almidón y valorar con tiosulfato hasta la desaparición del color. Anote la lectura, la cual debe ser sustraída del gasto del tiosulfato de la valoración que contiene yodato.

$$\text{Conc. real del tiosulfato (N)} = \frac{\text{mL de yodato utilizados}}{\text{mL de tiosulfato consumidos}} \times 0,02$$

• **PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE N-NO₂ EN AGUA**

Principio del método

El método para la determinación del ión NO₂⁻ se basa en la formación de un compuesto diazo altamente coloreado del ion NO₂⁻ con la sulfanilamida, y el dicloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina, el cual se mide en el espectrofotómetro a 543 nm. El ensayo de las muestras se realizara tan pronto como sea posible luego del muestreo, puesto que las bacterias presentes en el agua pueden causar la conversión total o parcial del ion nitrito a otras formas como nitrato o amonio. Las muestras que requieran ser almacenadas por 24 horas o menos, se refrigeran a 4 °C.

Calibración

Prepare la curva de calibración a partir de la solución patrón de nitrito, ver anexo 1, pipeteando los volúmenes especificados a continuación, en frascos volumétricos de 50 mL, y diluya hasta la marca.

Volumen en mL de solución patrón de N-NO ₂ ⁻ en 50 mL	Concentración en mg/L de N-NO ₂ ⁻
0,075	0,0015
0,125	0,0025
0,25	0,005
0,5	0,01
1	0,02
2	0,04
4	0,08

Desarrolle el color y mida la absorbancia de cada patrón. Plotee el valor de la absorbancia contra el valor de la concentración para obtener la curva de calibración lineal. La curva de calibración es confeccionada por el método estadístico de los mínimos cuadrados utilizando para ello el Software “CurveExpert”

Procedimiento de determinación del nitrito:

Si la muestra contiene sólidos suspendidos, filtre a través de un filtro membrana de diámetro de poro de 0.45 µm. Ajuste el pH de la muestra entre 5 y 9 con HCl 1N o NH₄OH 1N. Tomar 50 mL de muestra, o una porción diluida de la misma a 50 mL, y adicionar 2 mL del reactivo de color, mezclar bien. Proceda de igual manera con un blanco de agua destilada. Medir la absorbancia de la muestra (o de los estándares) a 543 nm contra blanco de reactivo utilizando cubetas de 5 cm de espesor, pasados diez minutos y antes de dos horas después de la adición del reactivo de color.

Cálculo, incertidumbre y expresión de los resultados.

Los datos obtenidos del ensayo (Absorbancia, Factor de dilución, etc) son llevados a la hoja de cálculo Excel desarrollada para el cálculo de la concentración y la incertidumbre. Esta hoja de cálculo da directamente la concentración y la incertidumbre asociada de la muestra objeto de ensayo y está ubicada en la PC del local de Ensayos Físico-Químicos de Aguas y Atmósfera.

Incertidumbre.

El cálculo de la incertidumbre se realiza de acuerdo al procedimiento L-SA-005, auxiliándose de la hoja de cálculo Excel confeccionada a tal efecto.

Los resultados se expresan de la siguiente forma:

Concentración $\pm u_{\text{exp}}$ (mg/L)

Donde:

u_{exp} (mg/L): Incertidumbre expandida ($K=2,57$).

Concentración: Concentración (mg/L) del analito.

Control de calidad del ensayo

Prepare un patrón a partir de la Solución patrón de N-NO₂⁻. La concentración a preparar debe ser de 0.02 mg/l de N-NO₂⁻ punto intermedio de la curva de calibración. Realice el mismo procedimiento al patrón que el que se realiza a la muestra. Ubique el valor obtenido de Absorbancia, concentración esperada del patrón, etc., en la hoja de cálculo Excel confeccionada para el gráfico de control correspondiente al ensayo (según procedimiento L-SA-006) la cual se encuentra en la PC del local de Ensayos Físico-Químicos de Aguas y Atmósfera. Realice este control cada vez que se ejecute el ensayo en el laboratorio.

Reactivos utilizados en la determinación

- 1.- Solución Stock de nitrito (100 mg N-NO₂⁻/L): Se seca a 110 °C por varias horas el nitrito de sodio anhídrido (NaNO₂ p.a.). Se disuelve 0,4928 g de la sal previamente secada en agua destilada y se diluye hasta 1L. Esta solución debe ser preservada con 1 mL de cloroformo como preservante. La solución es estable al menos 6 meses.
 - 2.- Solución Patrón de nitrito (1 mg de N-NO₂⁻ /L): Se transfieren 1 mL de la solución Stock a un frasco volumétrico de 100 mL y se diluye con agua destilada. Esta solución es de uso diario.
 - 3.- Solución Patrón de nitrito (1 mg de N-NO₂⁻ /L): Diluir 3,3 mL de Solución Patrón de NO₂⁻ (1000 $\pm$ 5 mg/L de NO₂⁻ ó 304,35 mg/L de N-NO₂⁻ CertiPUR Trazable a SRM de NIST) en 1000 mL con agua destilada. Se prepara diario.
 - 4.- Reactivo de color: Se le añaden a 20 mL de agua destilada agitando constantemente 5 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄ p.a) concentrado y 0,5 g de Sulfanilamida (p.a). Después de la disolución completa de la sulfanilamida adicionar 0,05 g de diclorhidrato de N-1 naftil-etilendiamina (p.a). Se agita hasta disolver y se diluye con agua destilada hasta 50 mL. Esta solución es estable hasta aproximadamente un mes si se conserva en frasco ámbar y refrigeración.
-

Equipos y utensilios utilizados en la medición

6. 1.- Espectrofotómetro con longitud de onda 543 nm.

7. 2.- Balanza analítica.

• PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE FÓSFORO EN AGUA

Principio del método

El ortofosfato presente en la muestra reacciona con molibdato de amonio y tartrato de antimonio y potasio para formar un complejo. Este complejo es reducido por el ácido ascórbico para formar un complejo altamente coloreado de azul. La intensidad del color es proporcional a la concentración de fósforo en la muestra.

Si bien este ensayo es específico solo para los ortofosfatos, otros compuestos del fósforo pueden ser convertidos a estos (ortofosfatos) utilizando las diferentes maneras de pretratamiento de las muestras aquí descritas.

Interferencias

Altas concentraciones de sílice (más de 20 mg/L de SiO_2) causan interferencias en los resultados de la concentración de fósforo.

Procedimiento analítico

Tome 50 mL de la muestra (o una alícuota diluida a 50 mL) y transfíralos a un frasco cónico de 125 mL. Adicione una gota de la solución indicadora fenolftaleína. Si se observa una coloración roja, adicione gotas de H_2SO_4 (31+69) hasta que desaparezca el color. Adicione 10 mL de reactivo combinado a la muestra y mezcle fuertemente por agitación del frasco cónico. Después de pasados 10 minutos, y antes de los 30, mida la absorbancia del color azul de la solución en cubetas de 5 cm de espesor utilizando un espectrofotómetro a 640 nm contra un blanco de reactivo (50 mL de agua destilada procediendo de la misma forma que la muestra).

Calibración

Para la determinación de la concentración de fósforo se realiza previamente una curva de calibración. Una serie de patrones es preparada a partir de la solución patrón de fósforo como se muestra en la siguiente tabla:

Volumen (mL) de solución patrón 2,5 mg/L de fósforo en 50 mL	Concentración de fósforo (P) mg/L
1,0	0,050
2,0	0,100
4,0	0,200
7,0	0,350
10,0	0,500

Para la determinación de la concentración de ortofosfato se realiza previamente una curva de calibración. Una serie de patrones es preparada a partir de la solución patrón de fósforo como se muestra en la siguiente tabla:

Volumen (mL) de solución patrón 2,5 mg/L de fósforo en 50 mL	Concentración de fósforo (P) mg/L
0,1	0,005
0,18	0,009
0,4	0,02
1.0	0,05
2.0	0,10
4.0	0,20
7.0	0,35
10.0	0,50

Adiciones 10 mL de reactivo combinado a cada patrón y mezclar por agitación. Después de pasados 10 minutos, y antes de los 30, mida la absorbancia del color azul en cubetas de 5 cm de espesor utilizando un espectrofotómetro a 640 nm contra la solución de referencia (50 mL de agua a la cual se adiciona 10 mL de reactivo combinado). Plotee el valor de la absorbancia contra el valor de la concentración para obtener la curva de calibración lineal. La curva de calibración es confeccionada por el método estadístico de los mínimos cuadrados utilizando para ello el Software “CurveExpert”

Incertidumbre y expresión de los resultados

Los resultados se expresan de la siguiente forma:

Concentración $\pm u_{\text{exp}}$ (mg/L)

Donde:

u_{exp} (mg/L): Incertidumbre expandida (K=3,18) para el fósforo y (K=2.45) para el ortofosfato.

Concentración: Concentración (mg/L) del analito.

Control de calidad del ensayo.

Prepare un patrón a partir de la solución patrón de P-PO₄-3 (Concentración 2,5 mg de P-PO₄-3/L). La concentración a preparar debe ser de 0.200 mg/l de P-PO₄-3, punto intermedio de la curva. Ubique el valor obtenido de Absorbancia, concentración esperada del patrón, etc, en la hoja de cálculo Excel confeccionada para el gráfico de control correspondiente al ensayo (según procedimiento L-SA-006) la cual se encuentra en la PC del local de Ensayos Físico-Químicos de Aguas y Atmósfera. Realice este control cada vez que se ejecute el ensayo en el laboratorio.

Procedimiento de limpieza de la cristalería utilizada en el ensayo.

Para la limpieza de la cristalería de este ensayo se utiliza detergente libre de fosfatos. Una vez terminado el proceso de fregado (punto anterior), enjuague con suficiente agua destilada hasta eliminar los vestigios de detergente y ponga a secar. Finalmente, mantenga la cristalería en una solución diluida de ácido clorhídrico hasta su utilización.

Reactivos utilizados en la determinación

1-Reactivo combinado: Se disuelven 0,5 g de ácido ascórbico (p.a) en 100 mL de solución mezcla (ver 1.1). Esta solución es estable una semana si se mantiene a 4 grados.

1.1- Solución Mezcla: Disolver 0,065 g de tartrato de antimonio y potasio (p.a) en aproximadamente 350 mL de agua destilada, adicionar 2,8 g de molibdato de amonio (p.a) y mezclar bien. Luego adicione con cuidado 35 mL de ácido sulfúrico concentrado (p.a) y deje enfriar. Diluir a 500 mL con agua destilada. Estable 1 año si se conserva en polietileno.

2-. Solución patrón de Fósforo (2,5 mg de P-PO₄-3/L): Tomar 7,7 mL de la solución patrón de PO₄-3 (1002 ± 2 mg/L de PO₄-3 ó 326,15 mg/L de P-PO₄-3 CertiPUR Trazable a SRM de NIST) y diluir en 1000 mL con agua destilada. Esta solución es de uso diario.

3-. Ácido sulfúrico (31+69): Mezclar 31 mL de H₂SO₄ concentrado (p.a) con 69 mL de agua destilada.

4-. NaOH (1N ó 40 g/L): 2 g de NaOH (p.a) se disuelven en 50 mL de agua destilada.

5-. Solución indicadora fenolftaleína (5 g/L): 0,5 g de fenolftaleína (p.a) se disuelve en 50 mL de etanol, adicionar 50 mL de agua destilada.

Nota aclaratoria: En caso de no disponer de una solución patrón de PO₄-3 (CertiPUR Trazable a SRM de NIST) se prepara un patrón interno de P-PO₄-3 de la siguiente manera:
Solución Stock de Fósforo (50 mg de P-PO₄-3/L): Disolver 0,2197 g de KH₂PO₄ (p.a) previamente secado a 110 grados por 1 hora en 1 L de agua destilada.
Solución patrón de Fósforo (2,5 mg de P-PO₄-3/L): Diluir 50 mL de Stock de Fósforo en 1 L de agua destilada.

Aparatos y utensilios utilizados

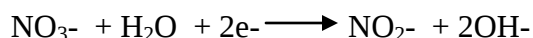
- 1.- Espectrofotómetro con longitud de onda de 640 nm.
- 2.- Útiles y cristalería de laboratorio.
- 3.- Plancha de calentamiento.

• PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE N-NO₃⁻ EN AGUA

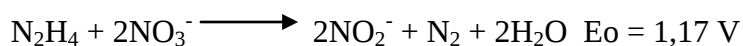
Principio del método

El presente método para cuantificar nitratos en aguas, se basa en el empleo de sulfato de hidracina como reductor de nitratos a nitrito (en un medio alcalino en presencia de trazas de cobre como catalizador de la reducción) y determinación del nitrito mediante la clásica reacción de Greiss.

El ión nitrato en medio alcalino se reduce a nitrito con un potencial normal de reducción de 0,01 V.



La reacción general en medio alcalino es la siguiente:



Conservación de la muestra e interferencias.

El análisis debe realizarse preferiblemente después del muestreo. De no ser posible las muestras pueden preservarse por la adición de 1 mL de ácido sulfúrico 4M. La materia suspendida y la coloración fuerte en la muestra interfiere y se elimina añadiendo 0,2 mL de solución de sulfato de magnesio y 0,2 mL de solución de hidróxido de sodio 4M por cada 100 mL de muestra. Agitar y después decantar la solución para su análisis.

Calibración

A partir de la solución de trabajo de nitrato se preparan una serie de soluciones estándar por dilución con agua destilada como se detalla en la siguiente tabla (que serán utilizadas

posteriormente para la confección de la curva de calibración) y se procede al tratamiento de estas de igual manera que las muestras.

Volumen de solución trabajo, mL / 50 mL	Concentración de N-NO ₃ ⁻ (mg /L)
0,64	0,009
1	0,014
2	0,028
3	0,042
5	0,07

Procedimiento de determinación del N-NO₃⁻

A la par con las muestras prepare dos blancos de reactivos con agua desionizada, al primero (blanco 1) se le adicionan todos los reactivos (ver 7.4.2 y 7.4.3) y al otro (blanco 2) se procede de forma similar pero sin la adición del reactivo de color (solo el 7.4.2). Luego proceda a realizar el mismo tratamiento que a las muestras y mida su absorbancia en cubetas de 5 cm de espesor utilizando un espectrofotómetro a 543 nm, utilizando agua destilada como referencia.

A 50 mL de muestra filtrada con papel de filtro cualitativo se le añaden 2 mL de la solución buffer de fenato y 1 mL del reactivo reductor hidracina-cobre. Mezcle vigorosamente y coloque en la oscuridad por un periodo de 24 horas. Transcurrido ese tiempo, adicionar 2 mL del reactivo de color y mezclar bien. Medir la absorbancia de la muestra a 543 nm pasados diez minutos y antes de dos horas después de la adición del reactivo de color, utilizando agua destilada como referencia y cubetas de 5 cm de espesor.

Confección de la curva de calibración, incertidumbre y expresión de los resultados

Para muestras de aguas salinas la absorbancia se corrige por el efecto salino asiendo uso del Anexo 3, y se realiza el cálculo de la Absorbancia Neta por la siguiente expresión:

$$A_{neta} = \frac{A_m}{Efecto_Salino} - (A_{b1} - A_{b2})$$

donde:

A_m = Absorbancia de la muestra (o solución estándar)

A_{b1} = Absorbancia del blanco 1

A_{b2} = Absorbancia del blanco 2

Plotee el valor de la absorbancia neta contra el valor de la concentración para obtener la curva de calibración lineal. La curva de calibración es confeccionada por el método estadístico de los mínimos cuadrados utilizando para ello el Software “CurveExpert”. Los datos obtenidos del ensayo (Absorbancia, Concentración de N-NO₂⁻, Factor de dilución, etc) son llevados a la hoja de cálculo Excel desarrollada para el cálculo de la concentración y la incertidumbre. Esta hoja de cálculo da directamente la concentración y la incertidumbre asociada de la muestra objeto de ensayo y está ubicada en la PC del local de Ensayos Físico-Químicos de Aguas y Atmósfera.

En muestras que hayan sufrido dilución los cálculos se corrigen por la expresión.

$$Conc(mg / L) = \frac{(A \times B)}{v}$$

donde:

A = concentración de N-NO₃⁻ obtenida a partir de la curva de calibración.

B = volumen de muestra tomado.

v = volumen final después de la dilución.

Incertidumbre

El cálculo de la incertidumbre se realiza de acuerdo al procedimiento L-SA-005, auxiliándose de la hoja de cálculo Excel confeccionada a tal efecto

Los resultados se expresan de la siguiente forma:

Concentración ± u_{exp} (mg/L)

Donde:

u_{exp} (mg/L): Incertidumbre expandida (K=3,18).

Concentración: Concentración (mg/L) del analito.

Control de calidad del ensayo.

Prepare un patrón a partir de la Solución de trabajo de N-NO₃⁻ (Concentración 0,7 mg de N-NO₃⁻/L). La concentración a preparar debe ser de 0.042 mg/l de N-NO₃⁻. Realice el mismo procedimiento al patrón que el que se realiza a la muestra. Ubique el valor obtenido de Absorbancia, concentración esperada del patrón, etc, en la hoja de cálculo Excel confeccionada para el gráfico de control correspondiente al ensayo (según procedimiento L-SA-006) la cual se encuentra en la PC del local de Ensayos Físico-Químicos de Aguas y Atmósfera. Realice este control cada vez que se ejecute el ensayo en el laboratorio.

Reactivos utilizados en la determinación.

Solución de trabajo de nitrato ($0,7 \text{ mg/L}$ de N-NO_3^-): Tomar $3,1 \text{ mL}$ de la solución patrón de NO_3^- ($1003 \pm 5 \text{ mg/L}$ de NO_3^- CertiPUR Trazable a SRM de NIST) y diluir en 1000 mL con agua destilada. Esta solución es de uso diario.

Reactivo reductor hidracina-cobre: Esta solución se prepara mezclando 25 mL de la solución de Sulfato de Hidracina (ver 2.1) con 5 mL de la solución de Sulfato de Cobre (ver 2.2), finalmente diluya a 50 mL con agua destilada.

Solución de sulfato de hidracina ($4,8 \text{ g/L}$): Disuelva en unos 200 mL de agua desionizada $1,2 \text{ g}$ de Sulfato de Hidracina (p.a) y ajuste el volumen a 250 mL .

Solución de Sulfato de Cobre ($0,393 \text{ g/L}$): Disolver $0,0393 \text{ g}$ de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (p.a) en 100 mL de agua desionizada.

Solución buffer de fenato: Disuelva $9,40 \text{ g}$ de Fenol cristalizado (p.a) en 200 mL de agua desionizada (si la solución se ve turbia se filtra a través de filtro cualitativo) y diluir a 250 mL . Mezclar 50 mL de esta solución con 16 mL de una solución de NaOH 1M y ajuste el volumen a 100 mL . La solución se guarda en un frasco ámbar y se desecha cuando se torne coloreada.

Reactivo de color: Se le añade a 20 mL de agua destilada agitando constantemente 5 mL de Ácido Fosfórico (H_3PO_4 p.a) concentrado y $0,5 \text{ g}$ de Sulfanilamida. Después de la disolución completa de la Sulfanilamida adicionar $0,05 \text{ g}$ de diclorhidrato de N-1 Naftil-Etilendiamina (p.a). Se agita hasta disolver y se diluye con agua destilada hasta 50 mL . Esta solución es estable hasta aproximadamente un mes si se conserva en frasco ámbar y refrigeración.

Ácido Sulfúrico (4M): Disuelva 28 mL de H_2SO_4 concentrado (p.a) en un pequeño volumen de agua desionizada, enfríe y diluya hasta 500 mL en agua desionizada.

Solución de Hidróxido de Sodio (4M): Disuelva 16 g de NaOH (p.a) en agua desionizada, enfríe y diluya hasta 100 mL en agua desionizada.

Solución de sulfato de magnesio (2M): Disolver 50 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (p.a) en agua destilada y diluir a 1 litro .

Nota aclaratoria: En caso de no disponer de una solución patrón de NO_3^- (CertiPUR Trazable a SRM de NIST) se prepara un patrón interno de N-NO_3^- de la siguiente manera:

Solución madre de nitrato (140 mg/L de N- NO_3^-): Se seca a 110 °C por varias horas el Nitrato de Potasio (KNO_3 p.a). Se disuelven 1,0111 g de la sal previamente secada en agua destilada y diluir a 1 litro.

Solución de trabajo de nitrato (0,7 mg/L de N- NO_3^-): Diluir 5 mL de la solución madre a 1 litro. Esta solución es de uso diario.

Equipos y utensilios utilizados

- 1.- Espectrofotómetro con longitud de onda 543 nm.
- 2.- Útiles y cristalería de laboratorio.