

**OBTENCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE MICROALGAS FOTOAUTÓTROFAS  
EN UN FOTOBIORREACTOR**

**ERIKA DANIELA GUTIÉRREZ CASTRO  
LUISA FERNANDA PARRA ARRIETA**

**Proyecto integral de Grado para optar el título de  
INGENIERO QUÍMICO**

**Director**

**Orlando Castiblanco Urrego**

**Ingeniero Químico**

**Codirector**

**Daniel Alejandro Lozano Rodríguez**

**Ingeniero Químico**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ, D. C.**

**2022**

## NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del Jurado

---

Firma del Jurado

---

Firma del Jurado

Bogotá, D.C., octubre de 2022

## **DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro.

**Dr. MARIO POSADA GARCÍA PEÑA**

Consejero Institucional

**Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA**

Vicerrectora Académica y de Investigaciones.

**Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN**

Vicerrector Administrativo y Financiero.

**Dr. RICARDO ALFONSO PEÑARANDA CASTRO**

Secretario General.

**Dr. JOSÉ LUIS MACÍAS RODRÍGUEZ**

Decano Facultad de Ingenierías.

**Ing. NALINY PATRICIA GUERRA PRIETO**

Director Programa de Ingeniería Química.

**Ing. NUBIA LILIANA BECERRA OSPINA**

## **DEDICATORIA**

Dedico este proyecto de grado con todo el amor a mi hermano Julio que ha sido mi ejemplo a seguir desde que tengo memoria, a mi papá que con su apoyo y sabios consejos me ha ayudado a llegar hasta este punto y especialmente a mi mamá que durante toda su vida luchó para darme lo mejor y gracias a su amor y sacrificio, pude llegar a culminar esta etapa de mi vida a pesar de ya no está conmigo. Desde el cielo sigue siendo una gran guía en mi camino y por supuesto, mi mayor inspiración para alcanzar todas mis metas.

A mi novio y mis amigas incondicionales que fueron parte fundamental para seguir adelante cuando que creí no poder continuar y especialmente a mi compañera de trabajo Erika Gutiérrez porque sin su amor, compromiso y apoyo en los momentos difíciles, completar este proyecto no hubiera sido posible.

***Luisa Fernanda Parra Arrieta***

Dedico este proyecto a mi madre que siempre ha estado a mi lado, apoyándome y enseñándome a que nunca debo darme por vencida a luchar hasta el final por cumplir mis sueños y que siempre me ha brindado todo su amor. A mi novio que siempre tuvo una voz de aliento en los momentos más difíciles enseñándome y ayudándome a buscar una solución para cualquier tropiezo, sacándome siempre una gran sonrisa y por supuesto a mi abuela que sin ella no sería la persona en la que me he convertido. al resto de mi familia que han sido incondicionales, sin ellos nada de esto sería posible.

A mis amigas que siempre fueron parte esencial y me inspiraron a ser un gran ser humano e ir mejorando cada día, en especial a mi compañera de tesis Luisa Parra que me enseñó el significado de la fortaleza y que por más difícil que sea la vida, cualquier adversidad hay que manejarla con todo el amor y la paciencia posible para seguir en pie con la frente en alto.

***Erika Daniela Gutiérrez Castro***

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos principalmente a Dios por ser nuestra guía en el desarrollo de este trabajo, a cada una de nuestras familias que nos brindaron el apoyo emocional y financiero, a nuestras amigas incondicionales que nos daban siempre una voz de aliento para seguir adelante.

Al director de trabajo Orlando Castiblanco Urrego por su apoyo y motivación para finalizar esta investigación, además para participar en otros proyectos que nos nutren de nuevos conocimientos y que nos enseñan a ser mejores profesionales cada día.

De igual forma un agradecimiento especial a los profesionales del SENA, como Liceth Cabrejo una gran microbióloga que nos guio en el desarrollo experimental de este proyecto, junto con Daniel Lozano que nos permitió ser parte de su grupo de investigación enseñándonos nuevos conceptos, a Cristian Ospina el encargado de toda la parte electrónica de este proyecto y a todo el equipo del Tecnoparque de Chapinero que nos acogió de la mejor manera permitiéndonos aprender de ellos y ser mejores seres humanos.

Finalmente, a la Fundación Universidad de América que nos preparó durante 5 años para ser buenas profesionales a pesar de las adversidades que puedan presentarse en el camino de la vida.

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>pág.</b>
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS	16
1. MARCO TEÓRICO	17
1.1 Alternativas energéticas	17
1.2 Biohidrógeno	18
1.3 Métodos para obtener hidrógeno	19
1.3.1 <i>Reformado</i>	20
1.3.2 <i>Pirólisis</i>	21
1.3.3 <i>Electrólisis del agua</i>	22
1.3.4 <i>Fotólisis</i>	23
1.3.5 <i>Gasificación</i>	23
1.4 Alternativas para la producción de biohidrógeno	24
1.4.1 <i>Biofotólisis</i>	25
1.4.2 <i>Fotofermentación</i>	26
1.4.3 <i>Fermentación oscura</i>	27
1.5 Microorganismos productores de hidrógeno	29
1.5.1 <i>Microalgas</i>	29
1.6 Chlamydomonas	30
1.6.1 <i>Morfología, reproducción y composición</i>	31
1.7 Medio de cultivo	32
1.7.1 <i>Autotrófico</i>	32
1.7.2 <i>Heterotrófico</i>	32
1.7.3 <i>Mixotrófico</i>	32
1.8 Automatización y control de Arduino para la cuantificación de biohidrógeno	33
1.9 Fotobiorreactores de sistema cerrado	33
1.9.1 <i>Reactores tubulares verticales</i>	34
1.9.2 <i>Reactores de pantalla plana</i>	34
1.9.3 <i>Reactores tubulares horizontales</i>	34

1.9.4	<i>Reactor anular de triple camisa</i>	34
2.	ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS DEL MEDIO DE CULTIVO IDEAL PARA MICROALGAS FOTOAUTÓTROFAS	35
2.1	Solución nutritiva de Hoagland y Arnon II	35
2.1.1	<i>Metodología</i>	37
2.2	Medio de cultivo TAP (Tris-acetato-fosfato)	38
2.2.1	<i>Metodología</i>	38
2.3	Especificaciones nutricionales para el crecimiento de microalgas fotoautótrofas	40
3.	AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS FOTOAUTOTROFOS DE LAS DIFERENTES MUESTRAS DE AGUA DEL HUMEDAL SANTA MARÍA DEL LAGO PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO	44
3.1	Metodología	44
3.1.1	<i>Dilución y rayado en agar</i>	46
3.1.2	<i>Reconocimiento de microalgas aisladas</i>	47
3.1.3	<i>Recuento de células en la cámara de Neubauer</i>	52
4.	DISEÑO CONCEPTUAL DE UN BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE HIDRÓGENO	56
4.1	Tipo de biorreactor y material	56
4.2	Relación entre la superficie iluminada y el volumen cultivo	57
4.3	Condición anaeróbica y suministro de luz	57
4.4	Control de temperatura	58
4.5	Esterilización	58
4.6	Construcción de los prototipos de fotobiorreactores	59
4.6.1	<i>Lectura obtenida de los sensores en los biorreactores</i>	66
4.7	Diseño conceptual de un fotobiorreactor	74
5.	CONCLUSIONES	76
	BIBLIOGRAFÍA	79
	GLOSARIO	79
	ANEXOS	



## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
Figura 1. Producción de hidrógeno mundial del año 2018	19
Figura 2. Métodos de producción de hidrógeno por reformado	20
Figura 3. Pirólisis del gas natural	21
Figura 4. Esquema del funcionamiento y reacciones de los diferentes tipos de electrolizadores	22
Figura 5. Proceso de fotólisis para obtener hidrógeno	24
Figura 6. Esquema de las principales alternativas de la producción de biohidrógeno	25
Figura 7. Rutas metabólicas de la producción de biohidrógeno por fermentación oscura	28
Figura 8. Morfología de la especie Chlamydomona	32
Figura 9. Diagrama de flujo del proceso de aislamiento	45
Figura 10. Observación microscópica de la presencia de una bacteria	48
Figura 11. Proceso de rayado secuenciado en agar	49
Figura 12. Medios de cultivo sin azufre inoculados con la muestra microalgal	51
Figura 13. Recuento celular del medio de cultivo TAP	53
Figura 14. Recuento celular del medio de cultivo Hoagland y Arnon II	54
Figura 15. Diagrama de flujo del proceso de obtención de hidrógeno	59
Figura 16. Fotografía de la prueba de funcionamiento de los sensores	63
Figura 17. Fotografía de la ubicación donde se ensamblaron los sensores	64
Figura 18. Fotografía del módulo controlador del sensor de pH y la placa de Arduino	64
Figura 19. Fotografía del montaje final del biorreactor sin biomasa	65
Figura 20. Biorreactor con el medio de cultivo sin incubación	66

Figura 21. pH arrojado por Arduino en pantalla LED para el medio Hoagland y Arnon II	67
Figura 22. pH arrojado por Arduino en pantalla LED para el medio TAP	68
Figura 23. Prototipo del biorreactor con el medio TAP y Hoagland en incubación	69
Figura 24. pH arrojado por Arduino en pantalla LED para el medio Hoagland y Arnon II después de 90 horas	70
Figura 25. Lectura de datos por medio del software de Arduino	70
Figura 26. Recuento celular del reactor Hoagland y Arnon II con producción de hidrógeno	72
Figura 27. Recuento celular del reactor TAP con producción de hidrógeno	73
Figura 28. Mapa de la ubicación del humedal Santa María del Lago.	84

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág.</b>
Tabla 1. Características de los métodos de producción de biohidrógeno	29
Tabla 2. Taxonomía de la Chlamydomona de la especie reinhardtii	31
Tabla 3. Fertilizantes para el medio de cultivo Hoagland y Arnon II	36
Tabla 4. Medio de cultivo Hoagland y Arnon II	37
Tabla 5. Soluciones que componen el medio TAP (Tris-acetato-fosfato)	39
Tabla 6. Medio de cultivo TAP	40
Tabla 7. Comparación de la preparación de los medios de cultivo	41
Tabla 8. Comparación de los medios de cultivo para el crecimiento de las Chlamydomonas	42
Tabla 9. Crecimiento de las colonias en medio TAP y medio Hoagland y Arnon II	47
Tabla 10. Imágenes microscópicas de las microalgas en cada medio de cultivo	48
Tabla 11. Imágenes de las colonias aisladas	50
Tabla 12. Imágenes de los materiales utilizados para construir el prototipo del biorreactor	61
Tabla 13. Imágenes de los sensores utilizados en el prototipo del biorreactor	62
Tabla 14. Resultados de la lectura de los sensores en el biorreactor con medio Hoagland y Arnon II	71
Tabla 15. Resultados de la lectura de los sensores en el biorreactor con medio TAP	71
Tabla 16. Resultados de recuento total de cada medio de cultivo	74
Tabla 17. Imágenes microscópicas de los microorganismos encontrados en medio TAP	86

## RESUMEN

Este documento muestra el proceso de obtención de hidrógeno a partir de microorganismos fotoautótrofos, más específicamente de microalgas de la especie *Chlamydomona*, las cuales se recolectaron del agua del Humedal Santa María del Lago. Este proceso tiene como etapas principales la recolección de muestra de agua, el crecimiento de las microalgas, el aislamiento de las *Chlamydomonas* y finalmente la producción del gas hidrógeno.

Se elaboraron dos medios de cultivo diferentes, medio TAP (tris-acetato-fosfato) y medio Hoagland y Arnon II y se realizó una comparación tanto de la preparación de estos, como de la influencia de los mismos en la etapa de crecimiento de las *Chlamydomonas*, dando como resultado que el medio de cultivo más adecuado para el desarrollo de esta especie de microalgas es el medio Hoagland y Arnon II.

Finalmente se construyeron dos prototipos de biorreactores a escala de laboratorio, cada uno con un medio de cultivo diferente, con los que se efectuó y evidenció la producción de hidrógeno, monitoreando permanentemente las variables temperatura y pH. Con los resultados obtenidos se propuso un diseño conceptual de un biorreactor para la obtención de hidrógeno.

**Palabras claves:** microalgas, *Chlamydomona*, incubación, medio de cultivo, humedal, diluciones, rayado en agar, aislamiento, hidrógeno.

## INTRODUCCIÓN

El cambio climático es un de las problemáticas ambientales más grandes del mundo, abarcando múltiples consecuencias negativas en el sistema físico, biológico y humano. El efecto invernadero, es el efecto por el cual la tierra se mantiene en condiciones óptimas para refugiar vida, de esta manera, la atmósfera es la que retiene parte del calor del sol, con la intención de mantener la temperatura media del planeta la cual sería de 18 °C bajo cero. Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, en Colombia, según el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (2019), se estima que para el año 2030 haya un incremento en la pérdida de cobertura de ecosistemas marinos y costeros como manglares, de los cuales Colombia cuenta con la mayor extensión del pacífico americano. [1]

Los humedales son ecosistemas que pasan desapercibidos, pero han reportado apreciables beneficios sociales, económicos y ambientales en el mundo; la función principal que cumplen los humedales es el almacenamiento de agua, recarga de acuíferos, protección contra tormentas y la retención de carbono. No obstante, el aumento de la temperatura, el aumento del nivel del mar y los cambios en la precipitación degradaran esta vida natural; por otro lado, la convención Ramsar, es el tratado intergubernamental que ofrece el marco para la conservación y el uso racional de los humedales y sus recursos. [2]

La industria petrolera en Colombia ha sido capaz de mantener la conservación en el sector social y económico a nivel nacional, sin embargo, el sector petrolero en el país ha venido afectando el medio ambiente, debido a la contaminación del agua utilizada en la extracción del crudo [463974-2020-I-GA.pdf \(uamerica.edu.co\)](#) y en especial a la implementación de combustible en los diferentes medios de transporte terrestre (carro, moto, autobús, tractor, tren, camión), los cuales funcionan con combustibles líquidos derivados del petróleo. [3]

El gas hidrógeno es considerado como el combustible ideal para el mundo, puesto que su uso adecuado como tal, reduciría la contaminación del aire, el calentamiento global y el medio ambiente estaría protegido de manera sustentable. El uso conjunto del hidrógeno y la electricidad, proveen opciones atractivas en la generación de energía y en el transporte. Desde el centro de tecnologías de transporte del SENA se realizó una prospección sobre la formación de una serie de tecnologías emergentes, siendo esta, una de las alternativas de energías renovables con potencial

para ser usada en el sector transporte, el desarrollo de estos sistemas puede ofrecer una distribución avanzada, reducir de costos de operación y disminución de emisiones de gases de efecto invernadero.[3]

El presente proyecto busca evaluar la implementación de nuevas tecnologías como lo es la producción de hidrógeno a partir de microalgas que serán encontradas en las aguas del Humedal Santa María del Lago en Bogotá, además de esto como objetivo principal será implementar un fotobiorreactor para que se desarrolle la microalga y con ayuda de este se podrá cuantificar la cantidad de hidrógeno obtenido

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la obtención de hidrógeno en un fotobiorreactor partiendo de microalgas fotoautótrofas.

### **Objetivos específicos**

- Determinar las especificaciones fisicoquímicas del medio de cultivo ideal para microalgas fotoautótrofas.
- Aislar los microorganismos fotoautótrofos de diferentes muestras de agua del humedal Santa María del Lago para la producción de hidrógeno.
- Diseñar conceptualmente un biorreactor para la obtención de hidrógeno.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Alternativas energéticas

La generación de energía a partir de combustibles fósiles ha sido una de las causas principales de contaminación del ambiente tanto del aire, como el agua y suelos. Es importante destacar que los recursos naturales han sido cada día más escasos, por los cambios climáticos drásticos. De acuerdo con la Secretaría Distrital de Ambiente SDA, en el 2012 el aporte de las emisiones de material particulado en Bogotá provino de fuentes móviles en un 58% y de fuentes industriales en un 42%. [4]

Por otro lado, el petróleo ha vivido una disputa desde hace tiempo, debido a la propuesta de su reemplazo por fuentes de energías renovables, esto ha llevado a explorar nuevas alternativas energéticas contando como ventajas su naturaleza inagotable, renovable y su utilización libre de polución, éstas han sido representadas como un valor central para la sostenibilidad ambiental, que a largo plazo preservarán la vida humana. [5]

Una de las alternativas energéticas que se ha estudiado las últimas décadas son los biocombustibles como reemplazo de la gasolina y el gasóleo, ya que debido a la crisis energética se buscan nuevas fuentes que sean capaces de producir energía limpia utilizando nuevas tecnologías, por ejemplo con la implementación de procesos biológicos o derivados de biomasa y organismos vivos como microalgas, plantas o bacterias que se basan principalmente en convertir la energía solar en energía química por medio de la fotosíntesis.

Dentro de los biocombustibles existen diferentes tipos, están los de primera generación que provienen de fuentes como el almidón, azúcares, grasas animales o aceites vegetales y se producen a partir de diferentes procesos como fermentación y/o esterificación. También están los de segunda generación que se obtienen a partir de biomasa que no se usa para producir alimentos, como la celulosa. Por otro lado, los biocombustibles de tercera y cuarta generación son producidos a partir de microalgas y algas modificadas genéticamente, respectivamente; estas últimas son las más innovadoras para dicha producción. [6]

Los biocombustibles de tercera generación son excelentes debido a que la implementación de microalgas garantiza una alta producción de biocombustible con un aproximado de 60.000L a 240.000L en el año ya que poseen un acceso más eficiente al agua, CO<sub>2</sub> y otros nutrientes en comparación con las plantas de primera y segunda generación. Teniendo en cuenta esto, se



encuentra el biodiesel, el butanol, el metano, el etanol y el hidrógeno entre los biocombustibles que se pueden obtener a partir de microalgas.

La producción de hidrógeno a partir de microorganismos fotosintéticos es uno de los estudios más innovadores para la generación de energía limpia, ya que no posee emisiones al medio ambiente de gases de efecto invernadero o gases contaminantes.

## 1.2 Biohidrógeno

El hidrógeno es el elemento más común en el universo, es un gas no tóxico, inodoro, incoloro, insípido y altamente combustible, tiene la mayor densidad energética en comparación con cualquier otro combustible conocido como el metano, gas natural o gasolina, de hecho, tienen un poder calorífico tres veces mayor que el del petróleo. [7]

Hay tres tipos de hidrógeno, el gris, el azul y el verde. Los dos primeros se extraen del gas natural, pero este proceso libera volúmenes muy grandes de CO<sub>2</sub> y aunque se puede obtener carbón al inyectar el CO<sub>2</sub> en cavernas (carbón capture o captura de carbón), este es un proceso con un costo muy elevado. Por último, está el hidrógeno verde, este se obtiene mediante el proceso de electrólisis el cual no produce emisiones de gases contaminantes. [8]

La conversión energética del H<sub>2</sub> es comparable a los procesos electroquímicos y de combustión. Una opción limpia para sustituir a los combustibles fósiles y mitigar algunos problemas medioambientales actuales, es el uso de hidrógeno en pilas de combustible, la potencia es dos veces más eficiente y sólo produce agua como subproducto, por lo que no contribuye a la emisión de gases de efecto invernadero.

Ecopetrol es de las empresas pioneras en Colombia en implementar proyectos y realizar investigaciones para la obtención de hidrógeno por medio de electrólisis. En este 2022 empieza la prueba piloto de la producción de hidrógeno verde en la Refinería de Cartagena, con un electrolizador de tecnología PEM (*Protón Exchange Membrana*) y 270 paneles solares, este piloto utiliza aguas industriales de la refinería para producir diariamente 20 kg de hidrógeno verde de alta pureza (99,999%). [8]

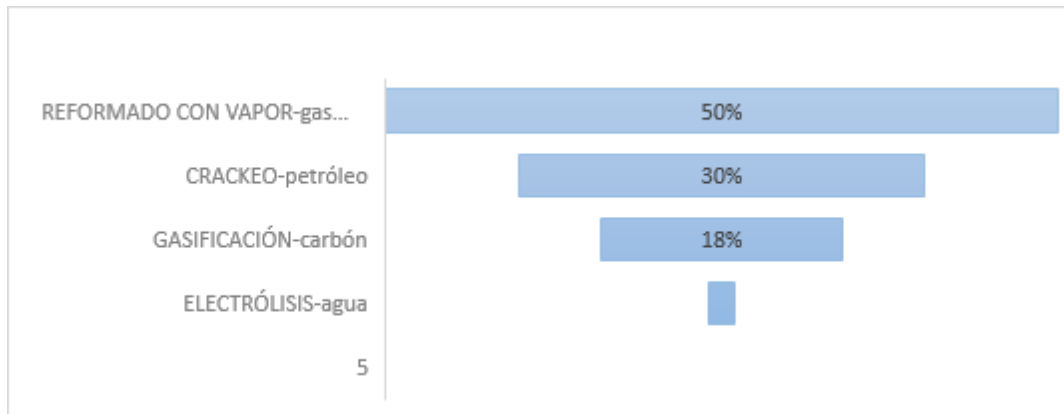
### 1.3 Métodos para obtener hidrógeno

Actualmente la fuente más común para la obtención de hidrógeno es el gas natural, su composición química (en su mayoría metano) y su relativo bajo costo hacen que sea la opción más interesante para obtener este elemento. El proceso de extracción del hidrógeno del gas natural es conocido como reformado, en donde se obtiene óxido de carbono como subproducto en una escala de once toneladas de CO<sub>2</sub> por cada tonelada de hidrógeno, también existe otra alternativa, la pirolisis de metano en la que se obtiene carbón en fase sólida y se obtienen tres toneladas de carbono por una tonelada de hidrógeno.

La obtención de hidrógeno en su mayoría es mediante recursos no renovables un 98% de la producción total de hidrógeno viene de fuentes fósiles como el gas natural (50%), el petróleo (30%) o el carbón (18%), así como se observa en la Figura 1. No hay un dato preciso de la electrólisis de agua y en caso de contar con ella el total de hidrógeno de origen no renovable ascendería más del 98%. [9]

**Figura 1.**

*Producción de hidrógeno mundial año 2018*



*Nota.* En esta figura se muestra una grafica con los diferentes porcentajes de producción de hidrógeno en el año 2018 según la materia prima a emplear Tomado de: P. D. Martínez, “Tecnologías De Producción De Hidrógeno Basadas En Métodos Biológicos,” *Ciemat*, pp. 8–13, 2020, [Online]. Disponible en: <https://www.ciemat.es/portal.do?TR=A&IDR=1&identificador=848>

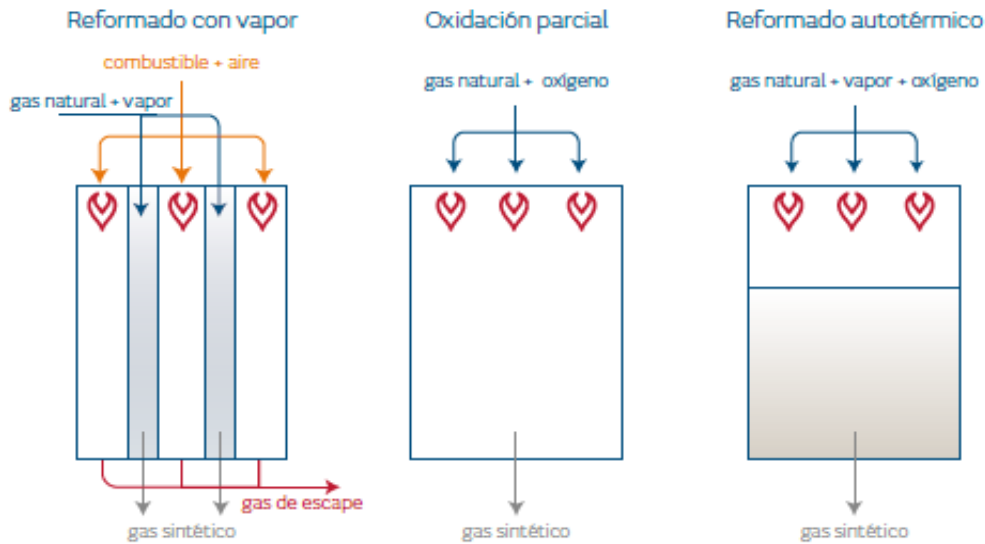
#### 1.3.1 Reformado

En este proceso existen tres factores claves a tener en cuenta, el primero es la temperatura ya que debe realizarse a 700°C – 1100°C aproximadamente, debe estar presente un catalizador en base níquel y por último, debe existir la presencia de un agente oxidante ya sea aire o agua (el más

usado es el vapor de agua), todo esto se debe cumplir para que la molécula de metano se logre descomponer y así le dé lugar al hidrógeno y a los óxidos de carbono. Existen tres métodos de producción en función del agente oxidante: reformado con vapor, oxidación parcial y reformado autotérmico.[10]

**Figura 2.**

*Métodos de producción de hidrógeno por reformado*



**Nota.** La imagen muestra las diferentes maneras para obtener hidrógeno por el método de reformado, así como también las materias primas y el producto final. Tomado de: Libro hidrógeno - Naturgy “Hidrógeno Vector energético de una economía descarbonizada”.

El vapor de agua es el agente oxidante más usado en el método de reformado del gas natural en el cual actúan dos reacciones. En la primera ocurre la descomposición parcial del metano en monóxido de carbono (CO) y tiene lugar a altas temperaturas, en la segunda se desplaza el agua y el gas que se utiliza para aumentar la porción de hidrógeno generado y a diferencia de la primera reacción, ocurre a bajas temperaturas. Sin embargo, en este método también se puede utilizar el aire como agente oxidante y se denomina oxidación parcial, puesto que si fuera completa la producción sería únicamente de carbono, agua y energía.[10]

### 1.3.2 Pirólisis

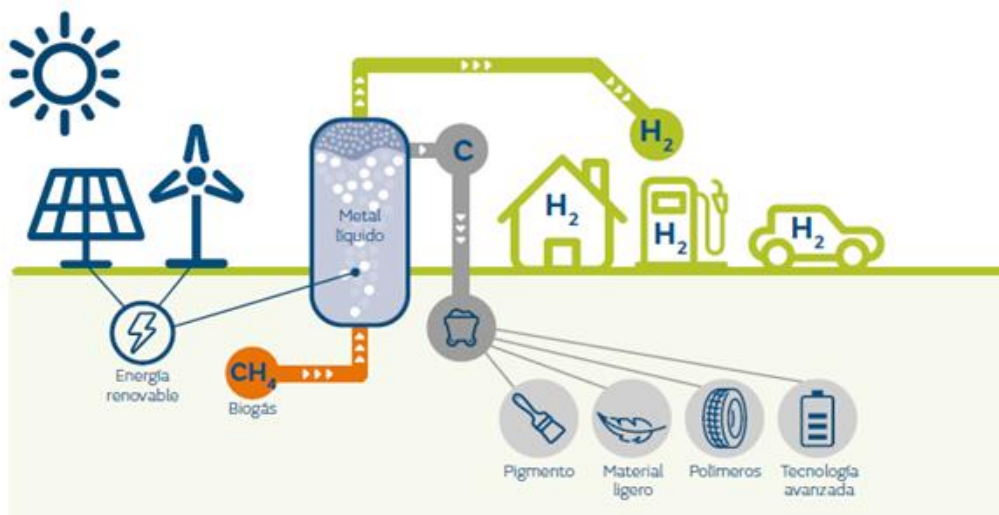
Este método permite la obtención de hidrógeno y carbono sólido mediante la descomposición del metano y también es conocido como craqueo térmico. En este proceso no se añade ningún

compuesto químico que contenga oxígeno en su estructura, además tiene lugar a temperaturas muy altas por lo que es un proceso endotérmico.

Es de vital importancia el manejo del carbono sólido ya que puede bloquear tanto los poros del catalizador como la hidrodinámica del propio reactor lo cual es clave para la viabilidad del proceso, para esto se ha planteado teóricamente el uso de metales o sales fundidas que son estables a altas temperaturas aproximadamente 1200°C. El carbón que se obtiene es puro y se puede utilizar en diferentes procesos como la producción de pigmentos o polímeros. [10]

**Figura 3.**

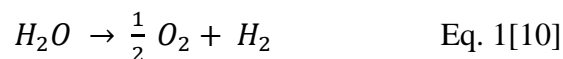
*Pirólisis de gas natural*



*Nota.* Esta figura muestra el proceso de obtención de hidrógeno a partir del método de la pirólisis de gas natural. Tomado de: Libro hidrógeno - Naturgy “Hidrógeno Vector energético de una economía descarbonizada”.

### 1.3.3 Electrólisis del agua

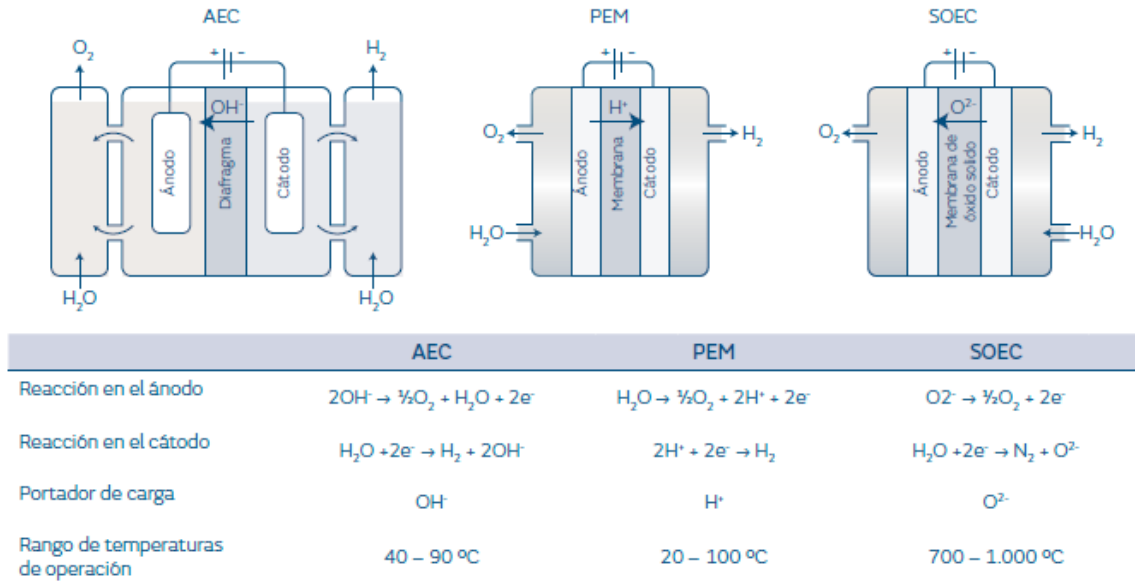
Este proceso básicamente consiste en la disociación del agua cuya reacción se muestra a continuación:



Existen tres tipos de tecnologías para la electrólisis del agua, la principal diferencia entre estas, es el material del electrolito, con mayor madurez tecnológica están los electrolizadores alcalinos (AEC), seguido de este existe la membrana de intercambio de protones (PEM) y con menor madures está el electrolito de estado sólido o de alta temperatura (SOEC).[10]

**Figura 4.**

*Esquema del funcionamiento y reacciones de los diferentes tipos de electrolizadores*



**Nota.** Esta imagen muestra los tres esquemas de funcionamiento de los diferentes tipos de electrolizadores dependiendo de cada electrolito, además se observa las reacciones que ocurren en cada etapa de este proceso. Tomado de: Libro hidrógeno - Naturgy “*Hidrógeno Vector energético de una economía descarbonizada*”.

### 1.3.4 Fotólisis

Teniendo en cuenta que la fuente básica de energía renovable es el sol, muchos estudios se han centrado en la utilización de fotones para romper directamente la molécula de agua (fotólisis). La irradiación sola suele ser utilizada por módulos fotovoltaicos para la generación de electricidad la cual se aplica a los electrolizadores, sin embargo los estudios e investigaciones se han enfocado en la disposición de los materiales que permiten que los reactores de producción de hidrógeno sean activados mediante la irradiación solar.[10]

La principal dificultad que no ha permitido la amplia utilización de este método, es la probable recombinación de los productos obtenidos a partir de las reacciones de reducción y oxidación, estas se dan debido a que la energía del fotón absorbido genera portadores que a su vez crean un proceso de catálisis en donde tienen lugar estas reacciones. Ya que los productos no se obtienen por separado, la eficiencia de conversión de la energía solar en energía química, disminuye.[10]

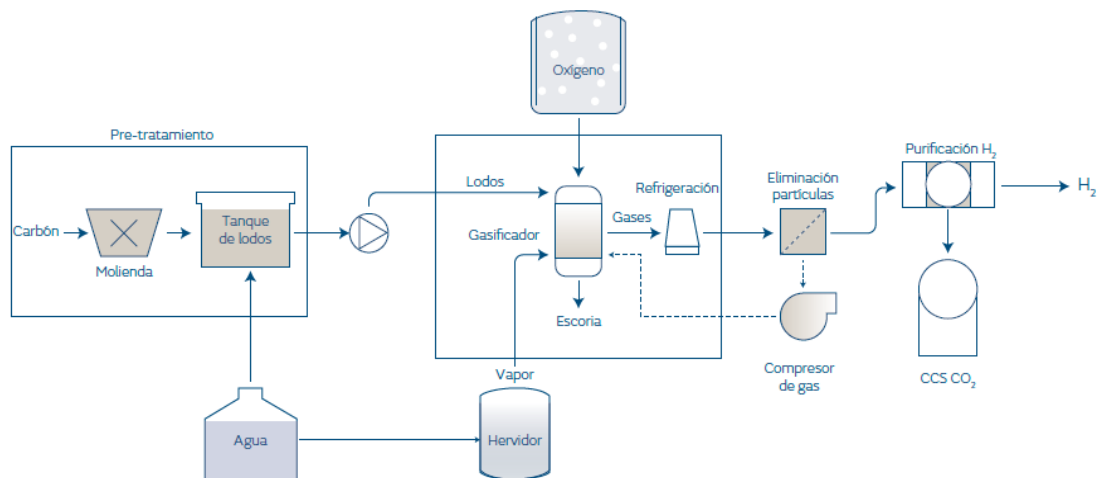
### 1.3.5 Gasificación

Este proceso tiene como producto final una mezcla de  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  (gas de síntesis) que se obtiene a partir de la conversión de la materia orgánica, la cual consiste en la oxidación parcial de un material sólido, por ejemplo se pone en contacto una fuente de hidrocarburos de cadena larga (fueloil, carbón, biomasa o residuos) con oxígeno y/o agua a una temperatura lo suficientemente alta como para romper sus cadenas y convertirlos a fase gaseosa, de esta manera se facilita su uso como combustible o para obtener un compuesto de forma separada ( $\text{H}_2$ ). Se debe tener en cuenta que el oxígeno debe estar en la forma más pura para que de esta manera la concentración del hidrógeno obtenido sea la más alta y así evitar la formación de nitritos y nitratos.

Como se menciona anteriormente, la temperatura es una condición de gran importancia para que el proceso pueda realizarse, por lo cual debe controlarse en un rango de  $1200^\circ\text{C}$  a  $1400^\circ\text{C}$ , estos valores se logran y conservan porque la reacción es exotérmica y no requiere de la presencia de un combustible como en el caso del reformado. Por otro lado el rendimiento incrementa con el aumento de la presión, sin embargo esta varía dependiendo de la tecnología y muchas veces puede tener lugar a presión atmosférica. [10]

**Figura 5.**

*Proceso de fotólisis para obtener hidrógeno.*



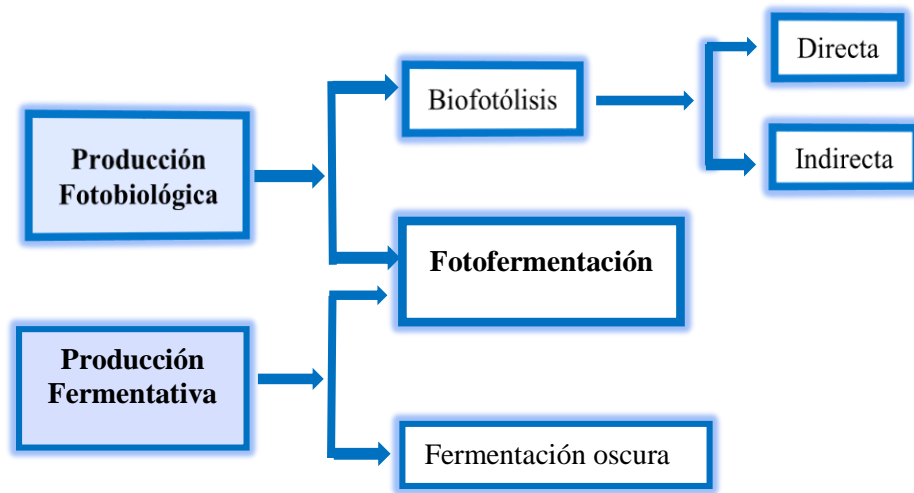
**Nota.** Esta figura muestra el diagrama de proceso de la obtención de hidrógeno a partir del método de fotólisis. Tomado de: Libro hidrógeno - Naturgy “*Hidrógeno Vector energético de una economía descarbonizada*”.

## 1.4 Alternativas para la producción de Biohidrógeno

Para la producción de biohidrógeno hay que controlar diferentes factores como los microorganismos involucrados, los nutrientes necesarios, la fuente de energía, la temperatura, el pH y la presencia o no de oxígeno, además existen diferentes rutas para obtener el gas hidrógeno, así como lo muestra el esquema en la Figura 6.

**Figura 6.**

*Esquema de las principales alternativas de producción de biohidrógeno*



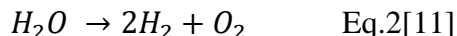
**Nota.** Este diagrama muestra las diferentes vías de acceso biológicos para obtener biohidrógeno en función de su fuente de energía, Tomado de: P. D. Martínez, “Tecnologías De Producción De Hidrógeno Basadas En Métodos Biológicos,” *Ciemat*, pp.8–13, 2020, Disponible en: <https://www.ciemat.es/portal.do?TR=A&IDR=1&identificador=848>

Hay oportunidades, en que los procesos mostrados en el diagrama anterior se realizan de manera secuencial combinándolos de acuerdo con las exigencias de cada microorganismo a utilizar para mejorar el proceso de producción de biohidrógeno. A continuación, se describirá brevemente en qué consiste cada una de estas opciones renovables.

### 1.4.1 Biofotólisis

La biofotólisis básicamente es un proceso orgánico para la producción de hidrógeno por medio de la hidrólisis del agua por fotosíntesis. En la biofotólisis directa se obtiene el hidrógeno por medio del sistema fotosintético de las microalgas, este transforma la energía solar en energía química en forma de  $H_2$ , para que esto ocurra, los microorganismos deben someterse a una incubación

anaerobia y a un tiempo de oscuridad, esto permite la producción de enzimas hidrogenasas que canalizan los protones ( $2H^+$ ) a hidrógeno gaseoso ( $H_2$ ).



Por otro lado, se encuentra la biofotólisis indirecta, este método es realizado por cianobacterias y algas verde azules en donde se genera hidrógeno molecular ( $H_2$ ) por medio del proceso fotosintético en el cual el  $CO_2$  es fijado a sustratos ricos en hidrógeno y al igual que en el método anterior, este proceso se realiza en condiciones anaerobias. Las cianobacterias sintetizan diferentes enzimas, pero la más importante es la nitrogenasa ya que esta cataliza la producción de hidrógeno mientras fija el nitrógeno. [11]

En la biofotólisis directa la fotosíntesis comienza con la absorción de luz por los pigmentos fotosintéticos (clorofilas, ficobilinas y carotenoides), que están asociados con los fotosistemas I (FSI) y fotosistema II (FSII) los cuales son complejos proteicos. La limitación de azufre en las células induce al proceso de producción de hidrógeno, el cual impide la actividad del FSII (fotosistema II) y en efecto la producción de oxígeno en los cloroplastos. El azufre es un macroelemento esencial que funciona como transportador de electrones. En ausencia de azufre, la síntesis de proteínas es impedida y el proceso del FSII (fotosistema II) es detenido esto conlleva a que la actividad disminuya y como consecuencia, también disminuye la producción de oxígeno por lo tanto las microalgas llevan a cabo la fotosíntesis anaeróbica para generar energía, consumiendo sustratos biológicos y liberando hidrógeno como mecanismo auxiliar [9]

Preferiblemente en estos procesos se utilizan reactores con superficies grandes para que la presencia de luz pueda aprovecharse al máximo. Se estima que, a máxima producción, se pueden producir casi 20 kg de hidrógeno gaseoso por 1000 m<sup>2</sup> de superficie de cultivo, lo que hace que sea un proceso con bajo rendimiento y un alto costo.[9]

#### **1.4.2 Fotofermentación**

En esta obtención los microorganismos son más selectivos, normalmente se utilizan bacterias púrpuras no sulfurosas, estos microorganismos son esencialmente mesófilos lo que significa que las temperaturas óptimas de crecimiento están entre 37-39°C. Este método es catalizado por la luz donde la enzima responsable de la producción es la nitrogenasa, la cual se encarga de transformar



el nitrógeno en amoníaco mediante la captación de protones lo cual permite la liberación de hidrógeno molecular. Por otro lado, los ácidos grasos son la principal fuente de electrones que muchas veces están contenidos en aguas residuales siguiendo mecanismos anaerobios. [9]

Este proceso fotofermentativo requiere de pH neutro o básico que oscile entre 6 y 9, el sustrato normalmente utilizado de las bacterias purpuras no sulfurosas, son los ácidos grasos volátiles como el acético, el butírico o el málico, sin embargo, nuevos estudios han usado sustratos ricos en azúcares como las melazas obtenidas durante el proceso de producción de azúcar.

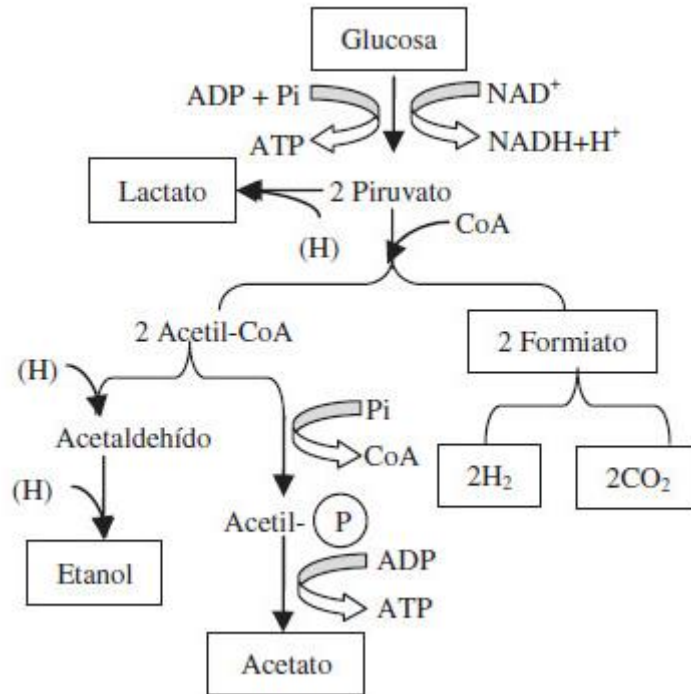
### ***1.4.3 Fermentación oscura***

Este método es uno de lo más prometedores ya que al producir hidrógeno no se necesita una sola especie microbiana, si no que se utilizan diferentes poblaciones de microorganismos de diferentes especies, además es importante mencionar que este tipo de producción acepta diferentes sustratos desde azúcares sencillos hasta biomasa lignocelulósica, residuos alimenticios y corrientes residuales, o glicerol lo cual lo hace aún más amigable con el medio ambiente y aporta al avance de la economía circular.[9]

La fermentación oscura maneja diferentes rutas metabólicas de acuerdo con el consorcio microbiano utilizado.

**Figura 7.**

*Rutas metabólicas de la producción de biohidrógeno por fermentación oscura*



**Nota.** Generación de hidrógeno con producción simultánea de acetato, etanol, lactato y formiato a través de la ruta de la glucólisis, una de las rutas utilizadas mediante fermentación oscura, Tomado de: S. A. Blanco Londoño and T. R. Chaparro, "Biohydrogen production from wastes via dark fermentation: A critical review (1993-2011)," *Ingeniare*, vol. 20, no. 3, pp. 398–411, 2012, doi: 10.4067/s0718-33052012000300014.

Según la ruta específica, a nivel microbiológico el biohidrógeno es un subproducto de la fermentación de materia orgánica de distintos ácidos grasos. Los microorganismos presentes transforman los azúcares, preferentemente glucosa, en diferentes ácidos grasos, produciendo (o en algunos casos consumiendo) hidrógeno. [9]

Por último, este es el proceso biológico para obtener hidrógeno que se ha realizado a escala piloto por su versatilidad en el sustrato y no es un proceso que requiera de mucho cuidado en la asepsia.

**Tabla 1.***Características de los métodos de producción de biohidrógeno*

<b>Método</b>	<b>Presencia de Luz</b>	<b>Uso de materia orgánica</b>	<b>Presencia de Oxígeno</b>	<b>Microorganismo</b>
<b>Biofotólisis Directa</b>	Si	No	No	Cianobacterias y Algas
<b>Biofotólisis Indirecta</b>	Si	No (generada en el metabolismo)	No	Cianobacterias y Algas
<b>Fotofermentación</b>	Si	Si (Ácidos Grasos)	No	Bacterias púrpuras
<b>Fermentación Oscura</b>	No	Si (Biomasa, Azúcares)	No (Tolerable)	Consortios microbianos

**Nota.** Esta tabla muestra el resumen de las características principales de cada método biológico de producción de biohidrógeno Tomado de: : P. D. Martínez, “Tecnologías De Producción De Hidrógeno Basadas En Métodos Biológicos,” *Ciemat*, pp.8–13, 2020, Disponible en: <https://www.ciemat.es/portal.do?TR=A&IDR=1&identificador=848>

## **1.5 Microorganismos productores de hidrógeno**

La obtención de hidrógeno por medio de los microorganismos fotosintéticos es una de las aplicaciones más prometedoras al momento de generar energías renovables, entre estos especímenes están las cianobacterias, las algas verde azules, bacterias púrpuras y las microalgas las cuales se caracterizan por tener una gran diversidad metabólica y ser capaces de producir compuestos de importancia industrial, nutricional y farmacéutica. [11]

### **1.5.1 Microalgas**

Las microalgas son microorganismos unicelulares eucariotas fotosintéticos, son fuente de clorofila, carotenoides, ficobiliproteínas, proteínas, exopolisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados y otros metabolitos biológicamente activos. Su importancia radica en su papel como productoras primarias de materia orgánica asimismo están presentes en ambientes con agua

como lo son lagos, mares y ríos, sin embargo, esto no exime la posibilidad de encontrarlas en ambientes terrestres, de hecho, se encuentran ampliamente distribuidas en la biosfera adaptada a una gran cantidad de condiciones incluso extremas. [12]

Algunas especies de microalgas son capaces de crecer empleando materia orgánica como fuente de carbono o energía haciendo que la producción de microalgas se divida en cuatro grupos:

1.5.1.a Fotoautótrofa. La energía la obtienen por medio del sol y los compuestos inorgánicos son la fuente de carbono.

1.5.1.b Fotoheterótrofa. El sol es la fuente de energía y los compuestos orgánicos la fuente de carbono.

1.5.1.c Mixotrófica. La fuente de energía la obtienen tanto de la luz como de la materia orgánica, mientras que la fuente de carbono son compuestos orgánicos y el CO<sub>2</sub>. Un ejemplo de estas algas son *Spirulina platensis* o *Chlamydomonas reinhardtii*.

1.5.1.d Heterótrofa. La fuente de energía y de carbono son los compuestos orgánicos, esto demuestra que existen algas que pueden desarrollarse en ausencia de luz como lo son *Chlorella protothecoides*. [12]

## **1.6 Chlamydomonas**

Para entender un poco más el proceso para la obtención de hidrógeno, hay que conocer a fondo el microorganismo con el que se va a trabajar, empezando por su morfología.

Según fuentes, la Chlamydomona se clasifica como una microalga verde eucarionte (clorofila) de morfología ovoide de aproximadamente 10 micrómetros de largo por 3 de ancho, y en su extremo anterior posee dos flagelos responsables de su movilidad y reproducción sexual [13] Esta microalga se encuentra en diferentes ambientes tales como suelos, aguas dulces, océanos, e incluso en la nieve. [16] Son clasificadas como células haploides y entre sus características más importantes se encuentra que son capaces de crecer en un medio sencillo de sales inorgánicas usando la fotosíntesis para proporcionar energía.

**Tabla 2.**

*Taxonomía de la especie Chlamydomona reinhardtii*

<b>REINO</b>	Viridilantae
<b>TIPO</b>	Chlorophyta
<b>CLASE</b>	Chlorophyceae
<b>ORDEN</b>	Volvocales
<b>FAMILIA</b>	Chlamydomonadaceae
<b>GÉNERO</b>	Chlamydomonas
<b>ESPECIE</b>	Chlamydomonas reinhardtii

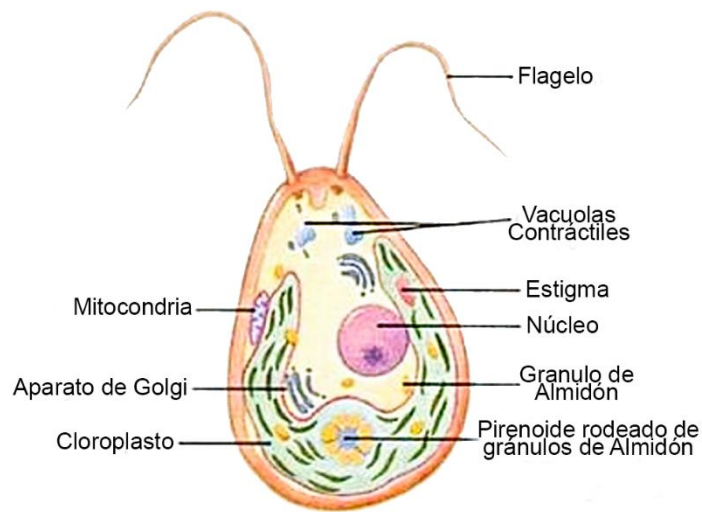
**Nota.** Esta tabla muestra la taxonomía de la microalga Chlamydomona. Tomado de: L. Lorena and C. Chicué, “Desarrollo de una ruta estratégica que realciona la proporción carbono nitrógeno (C/N) alimentado al cultivo de Chlamydomonas reinhardtii con la calidad del biodiesel,” 2016. Disponible en <http://www.metamicrobe.com/chlamy/#tax>

### **1.6.1 Morfología, reproducción y composición**

- Las Chlamydomonas se caracterizan por ser una célula eucariota y haploide cuya reproducción consiste en un ciclo sexual controlado.
- Su aparato fotosintético está estrechamente relacionado con el de las plantas, ya que posee genes de fotosíntesis codificados por ambos de los genomas nucleares y de cloroplastos.
- Una de las características más importantes dentro de su estructura es que posee una pared celular y la capacidad de crecer heterotróficamente, lo cual permite el aislamiento de otros géneros de microalgas que son incapaces de realizar la fotosíntesis.
- Las Chlamydomonas tiene un flagelo al igual que las células de esperma de animales, este les permite llevar a cabo fototaxis, moviéndose lejos o hacia la luz para maximizar la percepción de energía lumínica que requiere para realizar fotosíntesis o en el caso contrario minimizar el daño solar.
- Finalmente, la característica más interesante que hacen a las Chlamydomonas objeto de estudio es que pueden adoptar un metabolismo anaeróbico, lo cual fomenta la producción de gas de hidrógeno y metabolitos como formiato y etanol. [13]

## Figura 8.

### Morfología de la especie *Chlamydomona*



**Nota.** La imagen representa la morfología de la *chlamydomona* junto con sus organelos. Tomado de: Biology Boom. (Mayo de 2016). Type *Chlamydomonas* structure, Occurrence & reproduction. [En línea]. Disponible: <http://biologyboom.com/type-chlamydomonas-only-for-b-s/>

## 1.7 Medio de cultivo

Es una solución de nutrientes que se considera como un ambiente creado artificialmente el cual cuenta con las condiciones necesarias para que se dé el crecimiento microalgal. Teniendo en cuenta las fuentes de energía, carbono y nitrógeno, los medios de cultivo se pueden clasificar en tres tipos:

### 1.7.1 Autotrófico

Este medio de cultivo utiliza la luz natural o artificial como fuente de energía y  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono.

### 1.7.2 Heterotrófico

Mediante la oxidación de sustratos orgánicos obtiene la energía y el carbono, pero no todas las especies de microalgas pueden crecer en él.

### 1.7.3 Mixotrófico

Hay presencia de una fuente de carbono orgánico lo que permite que las microalgas realicen fotosíntesis. [13]

### **1.8 Automatización y Control de Arduino para la cuantificación de biohidrógeno**

La electrónica está presente en los procesos industriales, desarrollando sistemas electrónicos modulares y eficientes permitiendo su automatización, reduciendo considerablemente las tareas del operario, minimizando los errores humanos en la industria. El microcontrolador es la pieza clave para automatizar un proceso, es un circuito integrado con la capacidad de ser programable. Actualmente, el microcontrolador *ATmega328* por sus prestaciones que ofrece ha sido incorporado en las placas de Arduino. [14]

Arduino UNO, al ser una plataforma de libre acceso, se convierte en una alternativa viable e interesante de bajo costo, para el desarrollo de aplicaciones enfocadas al monitoreo y control de un proceso. Para que un sistema de control sea atractivo, dependerá del diseño de su interfaz, la interfaz es una herramienta interactiva que proporciona toda la información del sistema al usuario, permitiendo el análisis total de la información de forma clara y concisa. Actualmente, se puede hacer uso de una pantalla táctil como interfaz, permitiendo una gran facilidad en su programación como en la comunicación entre las placas de Arduino. [14]

Esta plataforma permite por medio de sensores cuantificar la cantidad de hidrógeno que se obtiene a partir de biofotólisis y otros métodos utilizando microalgas fotoautótrofas de especie *Chlamydomonas*.

### **1.9 Fotobiorreactores de sistema cerrado**

Los fotobiorreactores son equipos que requieren luz como fuente de energía para cosechar microorganismos fotoautótrofos. Estos organismos utilizan la fotosíntesis para generar biomasa a partir de la luz y de diferentes macro y micronutrientes. Los fotobiorreactores deben tener un medio de cultivo estable, controlando parámetros como temperatura, pH y concentración de oxígeno entre otros. Dependiendo de las condiciones del cultivo y del control para el microorganismo seleccionado, existen dos sistemas de cultivo distintos: sistemas abiertos y sistemas cerrados.[15]

Los fotobiorreactores de sistema abierto se consideran para la producción de biomasa, pero no para la producción de hidrógeno. Por lo tanto, solo se especificará principalmente equipos de sistema cerrado que se consideran los más aptos para el desarrollo de este proyecto.

### ***1.9.1 Reactores tubulares verticales***

Son tubos verticales transparentes de material de polietileno o vidrio) en los que la agitación se consigue con la ayuda de burbujeo en el fondo. Posee buenas propiedades de mezcla mientras que la configuración de la columna de burbujas tiene una aireación eficiente sin construcciones internas. En algunos biorreactores, el burbujeo se realiza por rociado por los lados.[16]

### ***1.9.2 Reactores de pantalla plana***

Estos fotobiorreactores de panel plano son utilizados debido a la alta relación A/V (área/volumen), cuando el espesor es mínimo. Sus lados transparentes y se utilizan en orientación vertical, inclinada u horizontal. En la producción a gran escala, varias placas se disponen en paralelo sobre un área. Además, se caracterizan por un área de transferencia de gas abierta, lo que reduce la necesidad de una unidad de desgasificación dedicada.[17]

### ***1.9.3 Reactores Tubulares Horizontales***

Este tipo de reactores se utilizan ampliamente por su orientación hacia la luz solar que da como resultado una alta eficiencia de conversión de luz. Este reactor tiene la configuración se implementan tubos largos en paralelos, tubos en bucle y deben estar cercanos. El principal inconveniente de este tipo de reactor es el control de la temperatura. La acumulación de oxígeno debido a la actividad fotosintética da como resultado el fotoblanqueo y, por lo tanto, reduce la eficiencia fotosintética [17]

### ***1.9.4 Reactor anular de triple camisa***

El reactor anular de triple cubierta consta de tres cámaras que comparten el mismo centro. Las bombillas fluorescentes se insertan en la cámara más interna. A su alrededor se encuentra la cámara de cultivo agitada con la ayuda de un agitador magnético. El reactor tiene una alta relación A/V y la temperatura se controla mediante la circulación de agua en el exterior.[17]



## 2. ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS DEL MEDIO DE CULTIVO IDEAL PARA MICROALGAS FOTOAUTÓTROFAS

En este capítulo se consultó información bibliográfica de las especificaciones fisicoquímicas de los dos medios de cultivo utilizados para el crecimiento de la microalga *Chlamydomona*, además de esto, se comprobó experimentalmente que la información encontrada era acertada para el desarrollo de las colonias de este microorganismo, por lo tanto se realizó la siembra de las muestras de agua recolectadas en el Humedal Santa María del Lago (la ubicación y características del lago, se especifican en el Anexo 1) en cada uno de los medios de cultivo. Cabe aclarar que hubo modificaciones en algunos aspectos al momento de realizar la experimentación, tales como la temperatura, pero aun así esto no impidió obtener los resultados requeridos.

Las exigencias nutricionales de las microalgas en la mayoría de casos son sencillas y la etapa de crecimiento se puede mejorar en gran medida mediante la adición de algunos macro y micronutrientes, con ayuda del control de luz y temperatura. Al realizar la revisión bibliográfica, se encontró que, para el desarrollo de la *Chlamydomonas*, existen diferentes medios de cultivo, más específicamente el medio de cultivo TAP (*Tris-acetato-fosfato*) y la solución Hoagland y Arnon II modificada. Estos medios cuentan con los nutrientes esenciales para el aumento de las células microalgales.

### 2.1 Solución nutritiva de Hoagland y Arnon II

La solución nutritiva Hoagland y Arnon se basa en las cantidades y propiedades de macro y micronutrientes absorbidas por los microorganismos, es una solución adecuada y empleada en cultivos hidropónicos los cuales son apropiados para realizar pruebas experimentales del crecimiento microalgal. Este suministra tres macronutrientes en forma de cationes como lo son el potasio, calcio y magnesio además de estos, agrega otros tres en forma aniónica que son nitrato, fosfato y sulfato finalmente se complementa la solución de macronutriente con micronutrientes. Cabe mencionar que esta solución nutritiva es utilizada en plantas para su apropiado crecimiento.

Este medio de cultivo tiene las concentraciones de los minerales en niveles máximos sin causar toxicidad o estrés salino. Otra propiedad importante de esta solución es que el nitrógeno es aportado como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). El aporte de nitrógeno en un equilibrio mixto de

cationes y aniones tiende a reducir el rápido aumento de pH del medio que normalmente se observa cuando el nitrógeno se aporta sólo como anión nitrato. [18]

Es importante resaltar los niveles de pH, esta propiedad es relevante y el rango debe encontrarse entre 5,5 y 6,0 ya que aumenta la solubilidad de sulfatos y fosfatos.[18]

**Tabla 3.**

*Fertilizantes para el medio de cultivo Hoagland y Arnon II*

<i>Fertilizante</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Peso molecular (g/mol)</i>	<i>Concentración en la solución (mg/l)</i>
<b>MACRONUTRIENTES</b>			
<i>Nitrato de Amonio</i>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	32,05	249,81
<i>Nitrato de Potasio</i>	KNO <sub>3</sub>	101,11	223,84
<i>Fosfato Monopotásico</i>	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	136,09	264,49
<i>Nitrato de Calcio</i>	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	350,11	158,95
<b>MICRONUTRIENTES</b>			
<i>Quelato de Hierro</i>	Fe-EDDHA (6% Fe)	435,20	36,67
<i>Cloruro de Manganeso</i>	MnCl <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	161,87	1,08
<i>Sulfato de Cobre</i>	CuSO <sub>4</sub> + 5H <sub>2</sub> O	249,68	0,08
<i>Sulfato de Zinc</i>	ZnSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O	287,54	0,04
<i>Molibdato de Amonio</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>2</sub> O <sub>24</sub> + 4H <sub>2</sub> O	756,16	0,05

**Nota.** Esta tabla muestra los fertilizantes y las cantidades de macro y micronutrientes que debe tener la solución Hoagland y Arnon II modificada Tomado de: “Efecto De La Concentración De La Solución Nutritiva Sobre La Biomasa De Microalgas Del Género Chlamydomonas” [En línea]. Disponible:<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/111421/Memoria%20de%20T%C3%ADtulo%20%28Yasm%C3%ADn%20Hun%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

### 2.1.1 Metodología

En este medio de cultivo se prepararon dos soluciones, una de macronutrientes y otra de micronutrientes cada una en frascos schott de 250 ml, como se muestra en la tabla 3. Finalmente, para la preparación de la primera prueba de la solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada, se agrega en un frasco schott 50 ml de macronutrientes y 50 ml de micronutrientes

obteniendo así 100 ml del medio de cultivo al cual se le adicionó 150 ml de la muestra tomada en el humedal.

Esta prueba se llevó a una incubadora LED con una temperatura de 15°C y con luz de 36 W por cuatro días, posterior a esto se añadió aire por medio de una manguera insertada en la tapa del schott y conectada a un pequeño motor aireador el cual duró dos días administrando aire, pasados estos dos días se desconectó la manguera del motor para convertir el medio a anaerobio y observar crecimiento y reproducción de los microorganismos a las condiciones mencionadas anteriormente. En la siguiente tabla se evidencia el procedimiento descrito.

**Tabla 4.**

*Medio de cultivo Hoagland y Arnon II*

<b>Macronutrientes y micronutrientes</b>	<b>Solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada</b>	<b>Solución nutritiva de Hoagland y Arnon II modificada con Oxígeno</b>
		

**Nota.** Esta tabla muestra las imágenes tomadas del medio de cultivo Hoagland y Arnon II modificada con y sin presencia de microorganismos.

## 2.2 Medio de cultivo TAP. (*Tris-acetato-fosfato*)

En la bibliografía consultada se encontró que las cepas de *Chlamydomonas*, presentan crecimiento en un medio salino. El medio TAP presenta una concentración de sales lo que favorece el crecimiento de las microalgas. Este medio de cultivo no solo cuenta con sales, sino que aparte de estas, requiere de otras soluciones como lo son la solución fosfato y la solución elementos de traza más conocida como oligoelementos.

### ***2.2.1 Metodología***

Para este medio de cultivo se realizaron tres soluciones: sales TAP, solución de fosfato y oligoelementos, en el caso de los oligoelementos se dejaron reposar a 3°C durante 10 días hasta que este se tornó de color café rojizo para poder ser utilizado. [19] Para las cantidades se usaron las mismas que se muestran en la tabla 5. Luego de tener las soluciones listas, se tomó de cada una el volumen correspondiente para realizar 200 ml de medio de cultivo TAP, así como se muestra en la tabla 5, agregándoles los gramos de tris base y los mililitros de ácido acético correspondientes. A la solución TAP de 200 ml se le adiciono 50 ml de una muestra de agua del humedal Santa María del Lago tomada el mismo día de la preparación para que esta no se dañara y fuera más efectiva.

**Tabla 5.***Soluciones que componen al medio TAP (Tris-acetato-fosfato)*

<i>Solución</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Concentración en la solución</i>
<i>SOLUCION FOSFATO</i>	1ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,8 (g/100ml)
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,4 (g/100ml)
<i>SALES</i>	25ml	NH <sub>4</sub> Cl	15 (g/L)
		MgSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	4 (g/L)
		CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2 (g/L)
<i>SOLUCIÓN OLIGOELEMENTOS</i>	1ml	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,14 (g/100ml)
		ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,2 (g/100ml)
		MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,5 (g/100ml)
		FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5 (g/100ml)
		CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,16 (g/100ml)
		CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,16 (g/100ml)
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,11 (g/100ml)
		EDTA	5 (g/100ml)
<i>ACIDO ACETICO</i>	1ml	CH <sub>3</sub> COOH	-
<i>TRIS BASE</i>	2,42g	H <sub>2</sub> NC(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	-

*Nota.* Esta tabla muestra las diferentes soluciones que se necesitan para la preparación del medio de cultivo TAP, así como también las cantidades y concentraciones correspondientes a cada uno. Tomado de [19] “TAP Medium,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2006, no. 1, p. pdb.rec560, 2006, doi: 10.1101/pdb.rec560.

Para este medio de cultivo la condición de temperatura fue diferente, la temperatura aumento 9°C pasando del rango de 15°C a 24°C, de igual manera se ingresó a la incubadora LED y se dejó durante una semana donde no se evidenció un mayor crecimiento de las microalgas.

Se decidió realizar una prueba de fotoperiodos para los dos medios de cultivo, la cual consistía en dejar 12 horas luz y 12 horas oscuridad donde se evidenció físicamente un color más verde del material microalgal, esto se hizo de acuerdo a la investigación que se realizó en Chile la cual es nombrada “Efecto De La Concentración De La Solución Nutritiva Sobre La Biomasa De Microalgas Del Género Chlamydomonas” donde hicieron pruebas de fotoperiodos 12:12 que finalmente se dejaron en 16 horas luz y 8 oscuridad, en esta tesis mencionan que es importante la

luz para el crecimiento, sin embargo su fase de oscuridad es de gran relevancia ya que las células realizan rápidas divisiones mitóticas durante este periodo.

**Tabla 6.**

*Medio de cultivo TAP (Tris-acetato-fosfato)*

Soluciones para TAP (Sales TAP, oligoelementos, sales fosfato)	TAP preparado + muestra	Incubadora LED
		

**Nota.** Esta tabla muestra las imágenes de las diferentes soluciones que se necesitan para la preparación del medio de cultivo TAP, el medio preparado más la muestra de agua y finalmente la incubadora LED que permite controlar las condiciones para el crecimiento microalgal.

Los medios de cultivos mezclados con la muestra microalgal se dejaron en la incubadora de 20 a 25 días en donde se evidenció un cambio en el color del cultivo mostrando varios tipos de microorganismos, esto llevo a tomar la decisión de comenzar a aislar la especie *Chlamydomonas* por medio de diluciones y rayado en agar.

### 2.3 Especificaciones nutricionales para el crecimiento de microalgas fotoautótrofas

La biomasa de microalgas consiste en una variedad de metabolitos principales y secundarios (proteínas, lípidos, carbohidratos, pigmentos, etc.), que están involucrados en varios procesos metabólicos o pertenecen a constituyentes celulares (componentes estructurales celulares, etc.). Se componen principalmente de carbono, pero también contienen muchos otros elementos (N, P, S, K, etc.) en diversas concentraciones. Los tres metabolitos principales en la biomasa de microalgas son los carbohidratos, los lípidos y las proteínas, donde su contenido total en la biomasa supera el 80%.

Para un crecimiento apropiado de microalgas, todos los nutrientes necesarios deben proporcionarse en cantidades adecuadas y formas biodisponibles. Si no se suministran los elementos esenciales, el resultado más posible será una disminución del crecimiento. En general, las microalgas tienen

una plasticidad en cuanto a sus requerimientos de nutrientes y podrían crecer cuando uno o más elementos se encuentran en concentraciones subóptimas. Sin embargo, esto podría tener un efecto negativo sobre el crecimiento porque existe una estrecha relación entre el contenido intracelular de determinados nutrientes y la tasa de crecimiento celular. Típicamente, hay un umbral de contenido de nutrientes intracelulares, llamado "cuota de subsistencia", por debajo del cual las algas no crecen más y el crecimiento se frena. [20]

La disminución del crecimiento celular debido a la limitación de nutrientes es el resultado de la disminución gradual de la captación de luz, la fijación de carbono y otros procesos metabólicos celulares como la producción de hidrógeno.

**Tabla 7.**

*Comparación de la preparación de medios de cultivo*

<b>PARÁMETRO</b>	<b>TAP</b>	<b>Hoagland y Arnon II</b>
<b>Temperatura</b>	Oligoelementos: 4°C	Ambiente
<b>pH</b>	6,1	5,7
<b>Tiempo</b>	1 a 2 semanas	1 hora

**Nota:** Esta tabla muestra los parámetros correspondientes a la preparación de cada medio de cultivo.

El tiempo de preparación de los medios de cultivo varía ya que según *Cold Spring Harb. Protoc* en "TAP Medium" los oligoelementos deben reaccionar a bajas temperaturas por lo menos dos semanas para poder ser utilizado, además en este protocolo "TAP Medium" se menciona que los valores de pH deben acercarse a 7.

Por otro lado para el medio de Hoagland y Arnon II según Y. Hun, en "Efecto De La Concentración De La Solución Nutritiva Sobre La Biomasa De Microalgas Del Género *Chlamydomonas*" el pH para este medio debe estar en un rango de 5,5 a 6,0.

**Tabla 8.**

*Comparación de los medios de cultivo para el crecimiento de Chlamydomonas*

<b>PARÁMETRO</b>	<b>TAP</b>	<b>HOAGLAND Y ARNON II</b>
<b>Temperatura</b>	26°C	26°C
<b>Tiempo de incubación</b>	3 a 4 semanas	5 a 6 semanas
<b>Luz</b>	176μmol (m <sup>2</sup> s)	176μmol (m <sup>2</sup> s)
<b>Oxigenación</b>	No	Si

**Nota:** Esta tabla muestra los parámetros correspondientes al crecimiento microalgal en cada medio de cultivo.

El valor de la temperatura para el crecimiento de la especie *Chlamydomonas* se ajustó de acuerdo a los valores estándar para medio TAP y para medio Hoagland y Arnon II que se muestran en las investigaciones “Potencial de algas verdes para la producción fotobiológica de hidrógeno,” y “Efecto De La Concentración De La Solución Nutritiva Sobre La Biomasa De Microalgas Del Género *Chlamydomonas*” respectivamente, las cuales evaluaron ciertas temperaturas para buscar un valor adecuado en la fase de crecimiento.

Teniendo en cuenta las tablas anteriores, se puede observar que pese a que ambos cultivos (TAP y Hoagland y Arnon II) sirven para el crecimiento de las microalgas de especie *Chlamydomonas* y que además se sometieron a las mismas condiciones de temperatura y luz, no comparten los mismos parámetros de preparación y crecimiento microalgal, por ejemplo, se evidenció mediante la observación en el microscopio que en el medio TAP crecieron microalgas de diferentes especies incluyendo a la *Chlamydomonas*, ver ANEXO 2, mientras que en el medio Hoagland y Arnon solo crecieron *Chlamydomonas* en su mayoría.

Como se puede evidenciar en la tabla 5, los reactivos para la preparación de medio TAP son abundantes en comparación a el medio Hoagland y Arnon evidenciados en la tabla 3, esto permite determinar que el medio TAP debido a la cantidad de reactivos y su extensa preparación, sea más costoso y requiera de un mayor tiempo para ser utilizado a gran escala.

Con lo dicho anteriormente, se determina al medio Hoagland y Arnon II como el mejor medio de cultivo para el crecimiento de las microalgas de especie *Chlamydomonas*, con el beneficio de que



tiene un menor costo de preparación y puede ser utilizado inmediatamente después de su elaboración en comparación con el medio TAP.

### **3. AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS FOTOAUTÓTROFOS DE LAS DIFERENTES MUESTRAS DE AGUA DEL HUMEDAL SANTA MARÍA DEL LAGO PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

Para el estudio de microorganismos, se han diseñado diferentes métodos que permiten su crecimiento en medios artificiales en donde es posible controlar condiciones como la temperatura, la presencia de sales, el pH y la intensidad lumínica que terminan siendo vitales para la incubación de microorganismos específicos; para que esto ocurra se transfiere una muestra microbiológica a un medio de cultivo en donde podrán crecer diferentes colonias, se debe tener en cuenta que en el lugar de trabajo y en general en el ambiente, existe la presencia de diferentes microorganismos que se deben controlar para que no contaminen los cultivos de estudio.

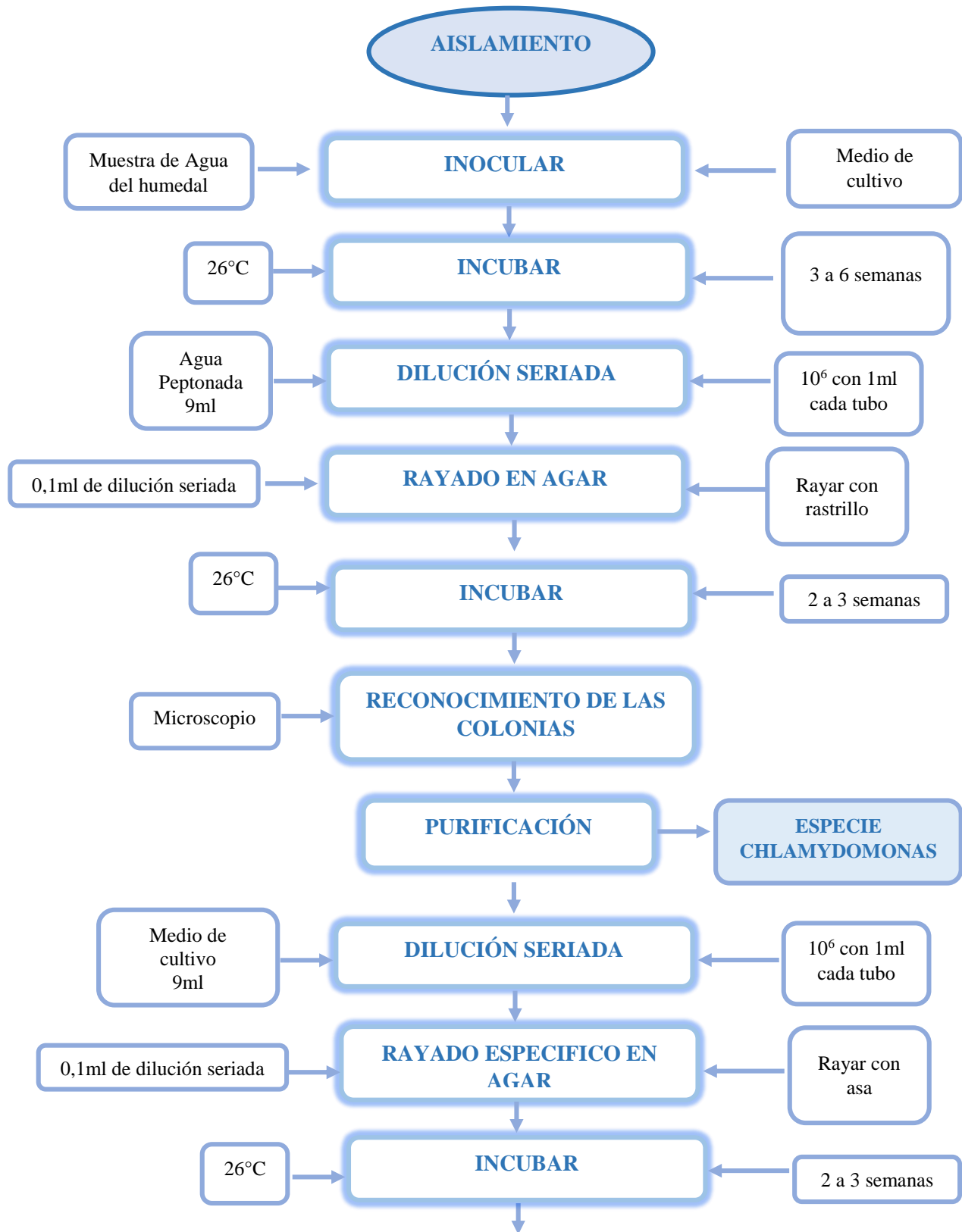
Es usual obtener cultivos mixtos a la hora de realizar la siembra de una muestra, por eso para llevar a cabo el estudio de una especie en específico es de gran importancia obtener cultivos puros, por lo tanto, se debe efectuar un proceso de aislamiento el cual consiste en promover intencionalmente el desarrollo de este microorganismo en medios de cultivo y condiciones controladas y así eliminar la presencia de otros microorganismos. Para obtener un cultivo axénico o puro, se debe inocular una sola célula en un medio sólido o líquido que haya sido previamente esterilizado, de esta manera se podrá multiplicar una sola especie de microorganismo y así lograr un clon el cual consiste en una población de células descendientes de un solo microorganismo que a su vez conformarán una colonia la cual es lo suficientemente grande como para ser visible en el medio de cultivo. Se debe tener en cuenta que después de cierto tiempo del crecimiento microbiano, la colonia debe ser transferida a un medio de cultivo nuevo para que los microorganismos puedan seguir creciendo de una manera más pura.

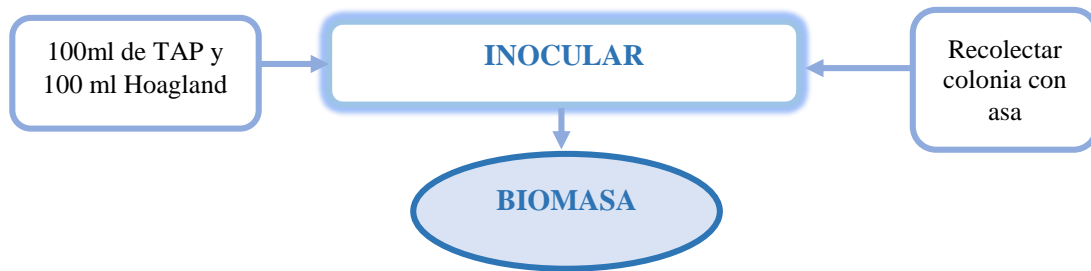
#### **3.1 Metodología**

El procedimiento que se mostrará a continuación por medio de un diagrama de flujo, se realizó con cada medio de cultivo (Hoagland y Arnon II y TAP), es importante mencionar que el aislamiento de las microalgas fue el mismo para los dos medios hasta la inoculación final

**Figura 9.**

*Diagrama de flujo del proceso de aislamiento*





**Nota.** Esta figura muestra el diagrama de flujo del proceso de aislamiento de las microalgas de especie *Chlamydomona*, en el cual se especifican las características y los elementos involucrados en cada etapa de este.

Luego de la preparación del material microalgal y su incubación, se observa el crecimiento de los clones microalgales, con esto se procede a la fase de aislamiento de la especie *Chlamydomona* para obtener la colonia pura. Este proceso se explica a continuación de manera jerárquica.

### **3.1.1 Dilución y Rayado en Agar**

Se utilizaron seis tubos de ensayo esterilizados previamente, a cada uno se le agregaron 9 ml de agua peptonada, en el primer tubo se agregó 1 ml de la solución microalgal preparada anteriormente. Se comenzó a realizar la dilución seriada la cual consiste en tomar un 1 ml del primer tubo agregarla al segundo tubo y del segundo tubo volver a tomar 1 ml y agregarlo al tercero y así sucesivamente hasta el tubo 6. Este procedimiento se realizó tanto con la solución microalgal Hoagland y Arnon II como con TAP.

Luego de tener listas las diluciones seriadas, se procedió a realizar rayado en agar en el cual se utilizaron 6 cajas Petri previamente esterilizadas en las cuales se sembró 0,1 ml de las seis diluciones en su respectiva caja rotulada con el número de tubo de ensayo también rotulado. Esta siembra se realiza con una micropipeta para sembrar los 0,1 ml en el agar y posterior a esto se hace un rayado superficial con un rastrillo de vidrio que previamente se esterilizó en la autoclave. Las placas se sellaron con vinipel para evitar contaminación, y se mantuvieron durante 20 días en la incubadora-LED.

**Tabla 9.**

*Crecimiento de las colonias en medio TAP y medio Hoagland y Arnon II*



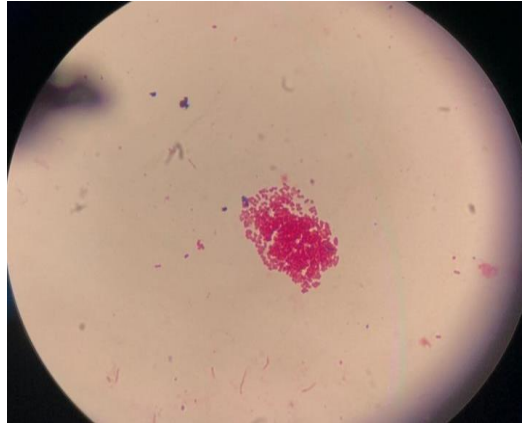
**Nota.** Esta tabla muestra las imágenes de las colonias que crecieron en cada medio de cultivo, tanto en agar (cajas Petri) como en disolución (tubo de ensayo). Las cajas en medio TAP son de las diluciones  $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^3$ , mientras que las de medio Hoagland son diluciones  $10^1$  al igual que el tubo de ensayo y  $10^2$ .

### **3.1.2 Reconocimiento de microalgas aisladas**

Posteriormente al visible crecimiento de las colonias, se procedió a realizar un reconocimiento de las microalgas aisladas, esto por medio de una observación en el microscopio en donde se identificó la presencia de diferentes especies de microalgas, además también se observó la presencia de otros microorganismos como bacterias y hongos, por lo tanto se escogieron las colonias 1 de la caja Petri marcada como “Hoagland NO TOCAR”, la colonia 2 de la caja “H  $10^1$ ”, la colonia 2 de la caja “H  $10^2$ ” y la colonia 3 de la caja “TAP  $10^1$ ”, en las cuales se observó una mayor presencia de las microalgas de especie *Chlamydomona*. En el Anexo 2 se puede detallar mejor las imágenes microscópicas de lo escrito anteriormente.

**Figura 10.**

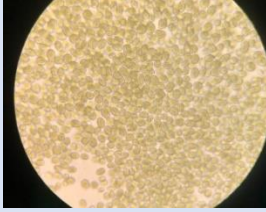
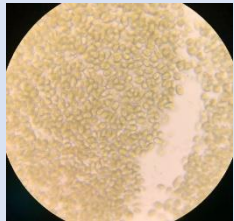
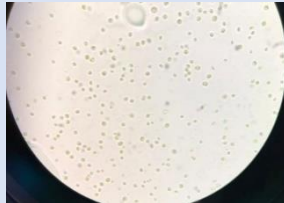
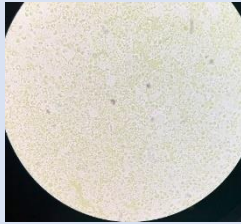
*Observación microscópica de la presencia de una bacteria.*



**Nota.** Esta imagen microscópica muestra la presencia de otro microorganismo (bacteria) en una de las muestras tomadas de las colonias que crecieron en el primer aislamiento.

**Tabla 10.**

*Imágenes microscopias de las microalgas en cada medio de cultivo*

TAP		HOAGLAND	
			

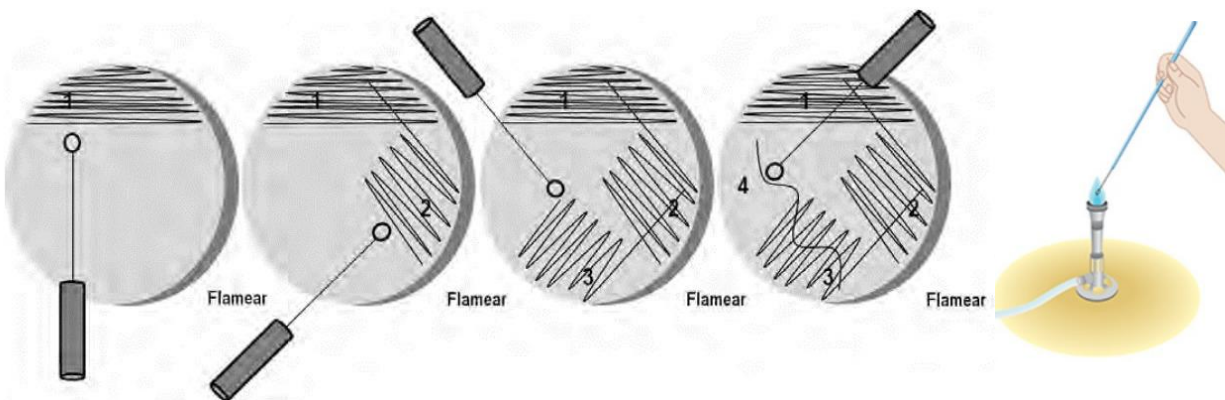
**Nota.** Esta tabla muestra las imágenes microscópicas de las colonias que crecieron en cada medio de cultivo, tanto en TAP como en Hoagland.

Luego de esta observación en el microscopio, se rectificó que las colonias presentes, eran mixtas y no puras, por lo tanto, se procedió a hacer dos aislamientos más para así asegurar la pureza de las colonias y evitar el crecimiento de otras especies que compitan por el alimento y no permitan el adecuado crecimiento de las Chlamydomonas.

Para estos aislamientos se realizó un rayado más específico el cual consiste en usar un asa redonda o de punta (dependiendo de la facilidad de recolección) para recolectar una muestra de las colonias elegidas. Es importante esterilizar el asa antes y después de cada uso utilizando un mechero hasta que se torne al rojo vivo, para enfriar el asa y evitar la muerte del microorganismo por calor, se puede utilizar la parte interna de la tapa de la caja Petri o una parte del agar en donde no haya presencia de colonias. Al recolectar la muestra se realiza el pase a otra caja Petri con un agar nuevo o a un tubo de ensayo con medio de cultivo. Para la siembra en la caja se debe hacer un rayado secuenciado en donde se debe flamear el asa después de cada sección de rayado, así como se muestra en la figura 9, esto permite que al final de la secuencia, la colonia pueda estar lo más pura posible. En cuanto a la siembra en los tubos de ensayo, se realiza la recolección con el asa teniendo en cuenta el flameado y se hace el pase a otro tubo en donde se agita un poco para que la colonia quede disuelta en el medio de cultivo y pueda crecer.

### Figura 11.

*Proceso de rayado secuenciado en agar*



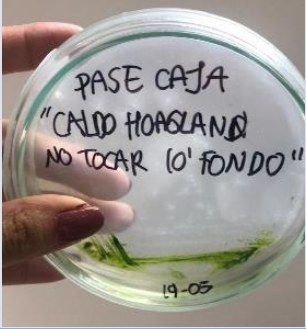
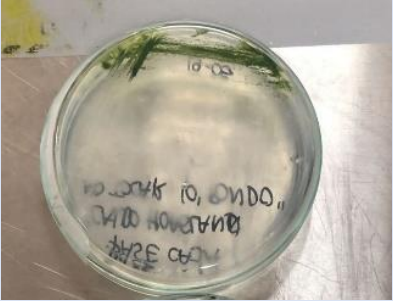

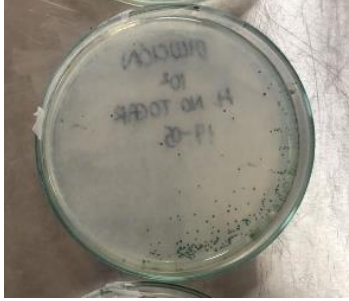
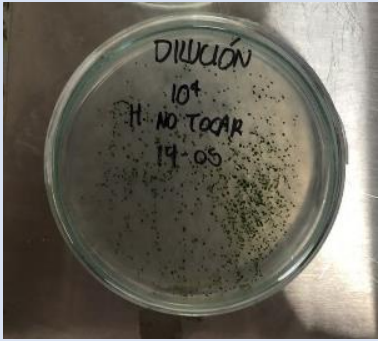

**Nota.** Esta figura muestra el proceso de rayado que se debe realizar para la obtención de la colonia microalgal en su mayor pureza, además muestra la importancia de flamear el asa después de cada secuencia. Tomado de [21] D. de Bromatología, “Procedimientos de Microbiología General,” *Pontif. Univ. Chile*, p. 1, 2021, [Online]. Available: Disponible en: <http://www6.uc.cl/manejoheridas/html/antiseptico.html>

La cuantificación de las colonias es posible realizarla siempre y cuando no hayan crecido de manera lineal o en forma de rayado como se evidencia en la primera foto de la tabla 11, lo cual hace que su cuantificación sea demasiado complicada, mientras que, en las últimas fotos de la misma tabla, se puede evidenciar las colonias de una manera más clara, lo cual hace posible su cuantificación. Esto se puede observar de una forma más amplia en el Anexo 3, en donde no solo

se muestran las colonias seleccionadas sino también su imagen microscópica en el objetivo 40x y 100x.

**Tabla 11.**

*Imágenes de las colonias aisladas.*

NOMBRES DE LA FUENTE MICROALGAL	COLONIAS DE CADA FUENTE
	
	
	

**Nota:** Esta tabla muestra las colonias que crecieron luego de realizar dos aislamientos para obtenerlas. Al lado izquierdo se encuentran las cajas Petri con el nombre de la fuente de la muestra microalgal, mientras que al lado derecho están las mismas cajas Petri, pero del lado contrario en donde se pueden observar mejor la presencia de las colonias en el agar.

Finalmente se procedió a inocular los microorganismos de especie *Chlamydomonas* en 100 ml de cada medio (TAP y Hoagland sin azufre). La preparación de estos medios con ausencia de azufre se realizó como se muestra en las tablas 5 y 3, teniendo en cuenta que los compuestos que contenían azufre se remplazaron por cloro, se eligió este elemento como remplazo debido a que es necesario

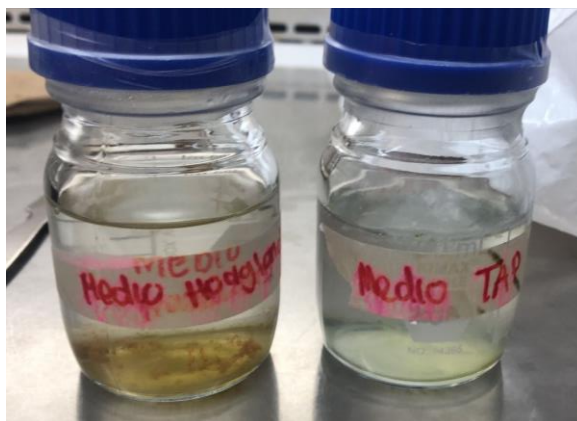


para que las microalgas puedan realizar su metabolismo, la fotosíntesis y al mismo tiempo ayuda al equilibrio iónico en el interior de las células, esto se realizó de acuerdo con el método de preparación del medio de cultivo encontrado en la Tesis, “Producción de hidrógeno molecular : fotosíntesis anóxica de *Chlamydomonas reinhardtii* y degradación de xilosa por una ruta enzimática sintética,”. Esta preparación es clave para la producción de hidrógeno ya que el método a elección es Biofotólisis y así lo requiere.

La inoculación se realizó con el fin de obtener un crecimiento microalgal puro y en una cantidad significativa de biomasa, de esta manera introducir las en los fotobiorreactores que se realizaran en el siguiente capítulo. Esta inoculación se dejó en la incubadora 10 días para acelerar su crecimiento.

**Figura 12.**

*Medios de cultivo sin azufre inoculados con la muestra microalgal*



**Nota.** Esta figura muestra 100 ml de los dos medios del cultivo sin azufre con los microorganismos de especie *Chlamydomonas* inoculados.

### ***3.1.3 Recuento de células en cámara de Neubauer***

Pasado los 10 días de inoculación en medio TAP y en medio Hoagland sin azufre, se procedió a hacer un recuento celular, esto para poder compararlos con la biomasa final presente en los reactores y analizar el aumento de las células con respecto a la producción de biohidrógeno.

Para el recuento de las células en cámara de Neubauer se siguieron los siguientes pasos

- a. Agitar el cultivo para permitir que las células tengan una distribución homogénea.

- b. Se toma 1ml de muestra con una pipeta Pasteur.
- c. Se llena con dos gotas la cámara con la muestra verificando que la rejilla quede toda cubierta y colocar un cubreobjeto para sostenerla, se observa al microscopio para verificar que las células tengan una distribución adecuada (no agrupada).
- d. Se enfoca la cámara con el objetivo 40x y el objetivo 100x , ya que existen células más pequeñas que otras. Esto facilita la identificación de las células, discriminando los residuos y demás objetos con tamaño similar a la especie que se está cultivando.
- e. El registro se hace contando las células que quedan dentro de cada una de las cuadrículas marcadas como Promedio A, B, C y D indicadas en la Figuras 12 y 13, discriminando las células que se encuentran en las líneas de cada cuadro.

Se contaron todas las células de la especie *Chlamydomonas* presentes en los 4 cuadros de 1 mm<sup>2</sup> marcados como Promedio A, B, C y D. La concentración celular se calcula de acuerdo con la fórmula

$$C = N \times 10^4 \times dil \quad \text{Eq.3 [22]}$$

En donde:

**C** = células/ml **N** = promedio de células presentes en 1 mm<sup>2</sup> (0.1 µl)

**N**= promedio de células presentes en 1mm<sup>2</sup> (0.1 µl)

**dil** = factor de dilución (cuando se considera necesario diluir la muestra. Es importante aclarar que si se usó 1 ml de muestra y 9 ml de agua sin células, el volumen total es 10 ml y el factor de dilución es = 10. **NOTA:** En este caso no hubo dilución por lo cual el valor es 1ml

**10<sup>4</sup>** = factor de conversión de 0.1 µl a 1 ml

**Figura 13.**

*Recuento celular del medio de cultivo TAP*

	11	20	22	28							55	60	77	43	
Promedio A: 27	30	27	45	31							40	52	68	72	
	28	12	40	25							38	70	54	65	Promedio B: 57
	30	26	20	29							52	45	75	41	
Promedio C: 52	22	38	44	78							60	32	41	73	
	54	41	52	82							74	55	38	62	Promedio D: 51
	16	56	43	67							59	47	20	56	
	45	62	55	52							63	42	39	55	

*Nota:* Esta figura muestra el recuento celular en la cámara de Neubauer en el medio de cultivo TAP en la cual un promedio de 47 células presentes en 1 mm<sup>2</sup>.

$$C = N * 10^4 * dil$$

$$C = 47 \text{ células} * 10^4 * 1ml \quad \text{Eq.4}$$

$$C = 4,7 \times 10^5 \text{ células/ml}$$



## **4. DISEÑO CONCEPTUAL DE UN BIORREACTOR PARA LA OBTENCIÓN DE HIDRÓGENO**

Teniendo en cuenta la información bibliográfica y los resultados obtenidos durante esta investigación, se ha demostrado la viabilidad de este método para obtener hidrógeno, sin embargo, la productividad sigue siendo demasiado baja para la implementación industrial.

Para el diseño de este fotobiorreactor es importante tener en cuenta diferentes factores claves para la producción óptima de hidrógeno, como el suministro de luz, la geometría del reactor, la relación entre la superficie iluminada y el volumen del cultivo, la condición anaeróbica, material del reactor y el control de temperatura.

### **4.1 Tipo de biorreactor y material**

Para las microalgas se pueden implementar tres tipos de biorreactor, el tubular, el de panel plano y anular de triple camisa. Para elegir el mejor se deben considerar aspectos importantes como la dispersión de luz y la relación superficie volumen y se ha demostrado que estos tipos de biorreactores son los más prometedores para la producción industrial de biomasa microalgal ya que estos ofrecen grandes beneficios de superficie y volumen, sin embargo las ventajas del biorreactor anular de triple camisa son más que las del tubular vertical y las del panel plano, por ejemplo, los reactores tubulares verticales tiene una relación de superficie iluminad y volumen reducida mientras que los de triple camisa tiene una relación media. Por lo tanto, para el diseño conceptual y el prototipo a realizar se tomó como referencia el fotobiorreactor anular de triple camisa ya que el libro “Biohydrogen Production Fundamentals and Technology Advances” muestra un mayor rendimiento de este fotobiorreactor al momento de producir hidrogeno con un valor de  $8.05 \times 10^{-5}$  (mol/ m<sup>3</sup> s) con una eficiencia del 3,7% en comparación con el tubular vertical que tuvo un valor de  $2.47 \times 10^{-4}$  con una eficiencia de 1,1%.

En cuanto al material se puede elaborar en polietileno o vidrio los cuales tienen un bajo costo y permiten una alta transparencia y relación área/volumen, productividad de biomasa y bajo riesgo de contaminación, sin embargo el vidrio no se puede utilizar en un prototipo de gran escala, por lo que los materiales más apropiados para la construcción de biorreactores son el PMMA (polimetilmetacrilato) y el teflón, conservando su transparencia durante meses al exponerse a condiciones climáticas naturales. Se ha visto que materiales como el caucho natural, el caucho de silicona y el polipropileno tienen efectos tóxicos en las células de algas privadas de azufre.[17]

También existen los reactores tubulares horizontales, pero su principal inconveniente es el control de la temperatura y la acumulación de oxígeno debido a la actividad fotosintética que da como resultado el fotoblanqueo y, por lo tanto, reduce la eficiencia fotosintética.

#### **4.2 Relación entre la superficie iluminada y el volumen de cultivo**

Teniendo en cuenta el factor de relación de superficie y volumen, se determina la cantidad de luz necesaria en el biorreactor, además este factor es directamente proporcional con la concentración celular y la productividad volumétrica.

Los reactores que tienen una alta relación de superficie y volumen son los anulares de triple camisa y de pantalla plana, estos últimos deben tener un espesor muy pequeño el cual permite que sean utilizados a gran escala.[17]

#### **4.3 Condición anaeróbica y suministro de luz**

Estos factores son importantes al momento de obtener hidrógeno por medio de un biorreactor, ya que, gracias al metabolismo de las microalgas, se requiere un ambiente en ausencia de  $O_2$  debido a que la acumulación de  $O_2$  es un obstáculo en reactores con alta relación superficie/volumen. Es necesario tener una unidad de desgasificación separada en la que la distancia entre la entrada y la salida sea tal que incluso las burbujas más pequeñas puedan desprenderse, por esto debe existir una condición anaeróbica para la transferencia de la cadena de electrones durante el metabolismo bioquímico.[15] Al mismo tiempo, el biorreactor debe proporcionar una cantidad de luz adecuada, usualmente su valor específico es aproximadamente de 2000 lux. Para cumplir con estos dos requisitos mencionados anteriormente, se utiliza vidrio o polimetilmetacrilato.

#### **4.4 Control de temperatura**

Para realizar un adecuado control de temperatura, se debe tener en cuenta la fuente de luz que se va a implementar en el biorreactor ya que esta puede aumentar el valor de la variable, por lo tanto, para tener un mejor control de la temperatura, en muchas ocasiones se pueden implementar mecanismos de enfriamiento adicionales para mantener el cultivo dentro del rango de  $24^{\circ}C$  y  $35^{\circ}C$ . Algunos de estos mecanismos son la inmersión de todo el cultivo en una piscina de agua, aspersión con agua, sombreado o la incorporación de un intercambiador de calor.[17]

#### **4.5 Esterilización**

Para este método la esterilización es uno de los ítems más importantes, ya que se trabaja con una sola especie de microalga, lo que exige una asepsia más rigurosa para el biorreactor. La estructura del biorreactor tubular y su superficie en lo posible lisa, facilita la limpieza evitando la formación de biopelículas en la pared y la acumulación de factores contaminante, por lo tanto, mantiene una alta transmisión de luz.

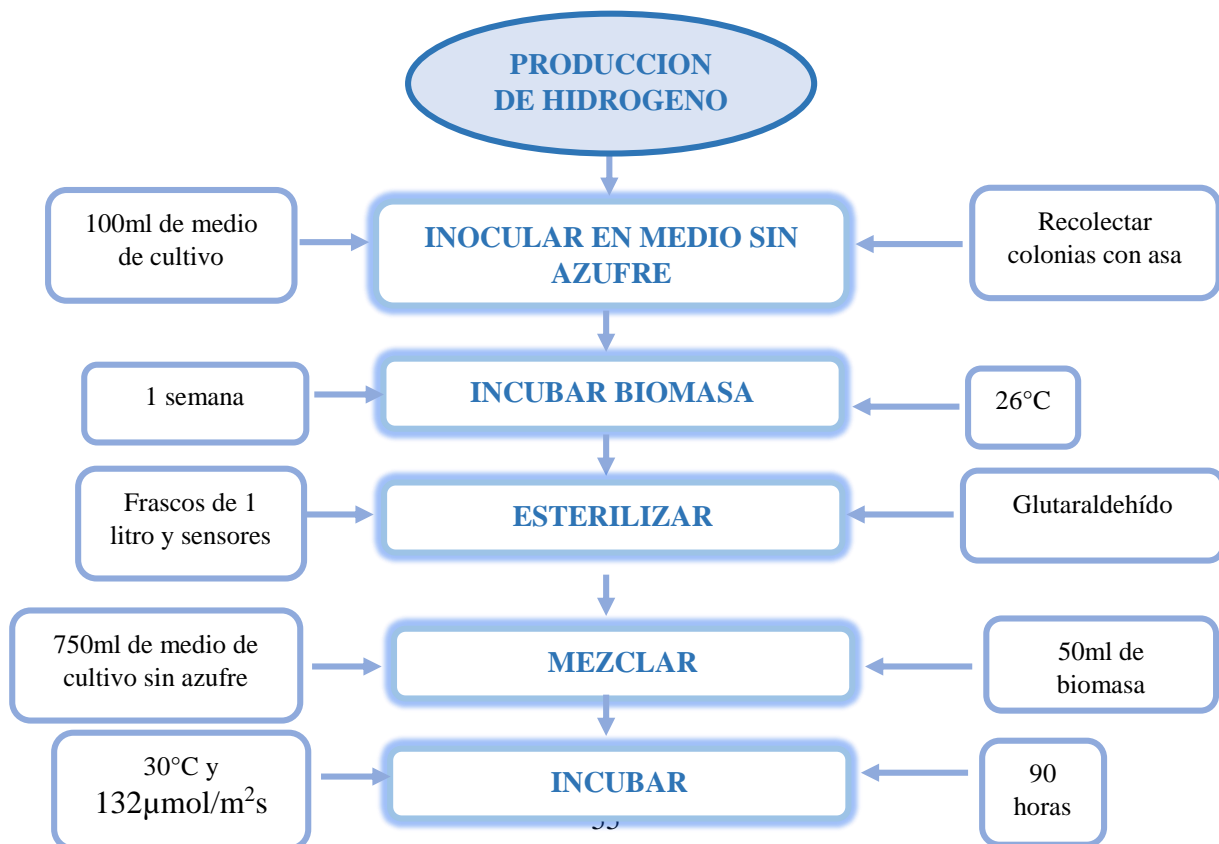
Para realizar la esterilización se puede aplicar una inyección de vapor a 120°C lo cual permitirá que el biorreactor se encuentre aséptico antes de ingresar la biomasa. [23]

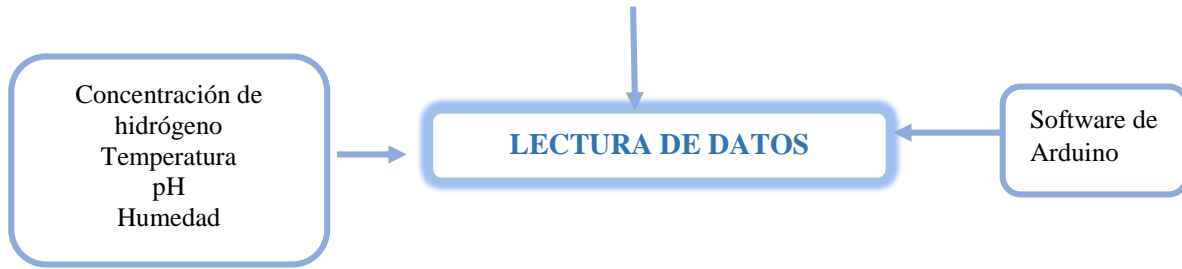
A continuación, se muestra la construcción de los prototipos de biorreactores a escala de laboratorio, los cuales se utilizaron para cuantificar la producción de hidrógeno a través del Software de Arduino, además se plantea un diagrama de flujo con el proceso de obtención de hidrógeno en donde se puede evidenciar cada etapa a seguir. Cabe mencionar que la etapa de mezclado se realizó en una cámara de flujo laminar, la cual tiene como finalidad eliminar posibles contaminantes presentes en el aire como bacterias, levaduras entre otros.

#### 4.6 Construcción de los prototipos de fotobiorreactores

**Figura 15.**

*Diagrama de flujo del proceso de obtención de hidrógeno*





**Nota.** Esta figura muestra el diagrama de flujo del proceso de producción de hidrógeno, partiendo de la etapa de inoculación hasta la lectura de los parámetros medidos por medio de los sensores (pH, temperatura, humedad, hidrógeno).

Como se mencionó anteriormente, el método de producción seleccionado es la biofotólisis directa lo cual es importante al momento de la elaboración de un prototipo de este equipo. Los factores que se tuvieron en cuenta para la biofotólisis fueron la ausencia de azufre, un ambiente anaerobio, la temperatura, el pH y la intensidad de luz. Estos factores fueron monitoreados




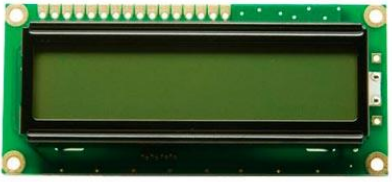


La construcción de estos biorreactores consistió en la implementación de cuatro frascos de plástico de boca ancha, dos de estos con un volumen de 1 litro y los otros restantes con un volumen de 3 litros, esto para que los frascos más pequeños pudieran ocupar el espacio adentro de los frascos más grandes y así tener un espacio entre los dos recipientes para introducir un sobre de anaerobiosis AnaeroGen de la marca Thermo Scientific y con esto mantener un ambiente libre de Oxígeno. Se eligió el plástico como material ya que posee un bajo costo y cumple con los requerimientos de transparencia necesaria para que las ondas de luz impacten la biomasa microalgal.

Para la cuantificación de hidrógeno se utilizó un sensor de hidrógeno (MQ8), un sensor de temperatura y humedad (DHT11), un módulo de sensor de pH análogo 0-14 con sonda BNC, una protoboard, una pantalla display LCD 16x2, cables jumpers macho-hembra y la placa de Arduino 1, adicional el módulo controlador del sensor de pH y la placa de Arduino se introdujeron en una pequeña caja de madera para protegerlos de la temperatura a la que se sometieron los biorreactores en la incubadora LED.



**Tabla 12.**


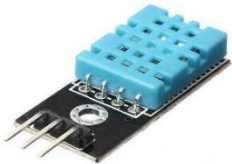

*Imágenes de los materiales utilizados para construir el prototipo del biorreactor*

<b>MATERIALES</b>		
<b>Protoboard</b>	<b>Cables jumpers</b>	<b>Arduino uno con cable plug tipo A para PC</b>
		
<b>Pantalla display LCD 16x2</b>	<b>Sobre de anaerobiosis AnaeroGen de la marca Thermo Scientific</b>	<b>Frascos de 1 y 3 litros</b>
		

**Nota.** Esta tabla muestra las imágenes y los nombres de los materiales que se utilizaron para la construcción completa de los dos prototipos de biorreactores.

**Tabla 13.**

*Imágenes de los sensores utilizados en el prototipo del biorreactor*

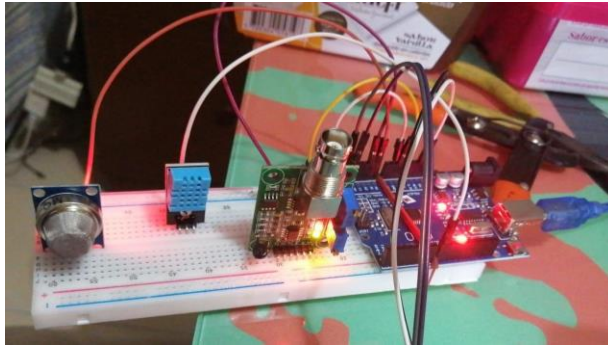
SENSORES		
Sensor de Hidrógeno-MQ8	Sensor de temperatura y humedad -DHT11	Módulo de sensor de pH análogo 0-14 con sonda BNC
		

**Nota:** La tabla anterior muestra el nombre y las imágenes de los sensores que se utilizaron en la construcción del prototipo del biorreactor a escala laboratorio para la producción de biohidrógeno

Los cables jumpers se utilizaron para las entradas de señales análogas y digitales en cada sensor. estos cuentan con un símbolo para conectarlos, A0 para sensor de hidrógeno, A1 para sensor de pH, A4 y A5 para la visualización de la pantalla LCD, las cuales están conectadas a la placa de Arduino 1 que tiene una entrada de 5 voltios y un punto de tierra (0 voltios). Por otro lado, a la protoboard se conectaron las entradas de alimentación y se procedió a escribir un código de programación para cuantificar los valores arrojados por cada sensor, este código se puede visualizar en el Anexo 3.

## Figura 16.

*Fotografía de la prueba de funcionamiento de los sensores*

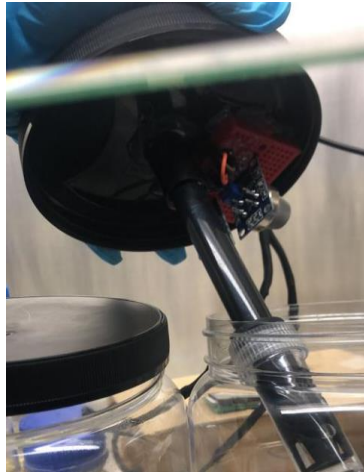


**Nota.** En esta figura se muestra la fotografía de un ensayo, en donde se conectaron todos los sensores al Arduino y a la protoboard, para verificar su adecuado funcionamiento en la programación.

Luego de ensamblar y conectar todos los sensores como se muestra en la figura 14, se realizó una prueba de funcionamiento en donde se verificó que cada sensor estuviera en óptimas condiciones para realizar la lectura de cada variable. Al verificar el correcto funcionamiento de cada sensor, se procedió a la instalación de los mismos en la parte interna de las tapas de los frascos de 3 litros de boca ancha, con el fin de ubicar el sensor de pH de la mejor manera para que estuviera en contacto con el medio de cultivo del frasco de 1 litro y que los demás sensores estuvieran a una corta distancia para una mejor lectura en un ambiente anaerobio.

**Figura 17.**

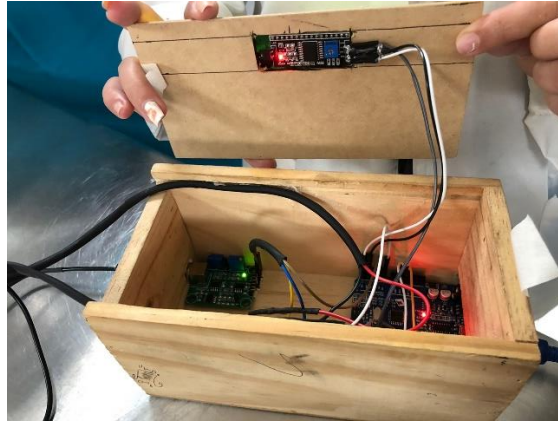
*Fotografía de la ubicación  
donde se ensamblaron los  
sensores*



*Nota.* Esta figura muestra la fotografía del montaje de los sensores que se incorporaron en la tapa de los frascos grandes de boca ancha para la lectura de hidrógeno, temperatura, humedad y pH.

**Figura 18.**

*Fotografía del módulo controlador del sensor de pH y la placa de Arduino*



**Nota.** Esta fotografía muestra la caja de madera que protege de la temperatura a la que se sometieron los biorreactores en la incubadora LED, la protoboard, el módulo controlador del sensor de pH y la placa de Arduino que van conectados a la pantalla LED.

De los sensores previamente instalados en las tapas de los frascos, sale la sonda del sensor de pH a su modulo controlador junto unos cables tipo macho-macho alargados con cables de alambre cubiertos de cinta negra termoencogible que se conectan a la caja de madera de protección.

### **Figura 19.**

*Fotografía del montaje final  
del biorreactor sin biomasa*



**Nota.** Esta figura muestra la fotografía del montaje final del prototipo del biorreactor sin medios ni biomasa, con todos los sensores y materiales adicionales exceptuando el sobre de anaerobiosis.

Luego del montaje final de los reactores sin biomasa, se procedió a esterilizar de manera química cada material con glutaraldehído al 25% ya que tiene una acción antiséptica y desinfectante para todos los microorganismos incluidas las bacterias gram+ y gram-[24] , lo que permite reducir el riesgo de contaminación. Posterior a este proceso, en los frascos de menor tamaño como se ve en la figura 12, se añadieron 750 ml de medio de cultivo TAP sin azufre y de igual manera se añadió el mismo volumen de medio de cultivo Hoagland y Arnon II sin azufre en el otro frasco de 1 litro, adicionando a cada uno 50 ml de biomasa respectiva a los medios inoculados previamente como se muestra en la figura 11. Ya preparados los medio en los tarros pequeños con su respectiva biomasa se agregaron a los tarros grandes, se introdujo en medio de los dos tarros un sobre de anaerobiosis abierto y se selló con la tapa del tarro más grande que contiene los sensores como se muestra en la figura 15. Es importante mencionar que se calibró el sensor de pH con agua destilada, ya que se conoce el valor estándar de este líquido.

## Figura 20.

*Biorreactor con medio de cultivo sin incubación*



*Nota.* Esta figura muestra la fotografía de uno de los prototipos de los biorreactores antes de ser ingresados a incubación y a producción de hidrógeno con el sobre de anaerobiosis.

### **4.6.1 Lectura obtenida de los sensores en los biorreactores**

4.6.1.a Datos obtenidos de los biorreactores sin incubación. Se realizaron lectura de datos antes de ser incubados a las condiciones seleccionadas para la producción de hidrógeno, esto se hizo con el fin de poder comparar las concentraciones iniciales y finales de biohidrógeno por medio del Software de Arduino en donde se arrojaron los siguientes resultados.

#### **A. Datos del prototipo del biorreactor sin incubar con el medio Hoagland y Arnon II**

Por medio de los sensores se pudo obtener un valor de hidrógeno de 56 ppm con una temperatura de 27°C y humedad del 23 %, el valor de la fracción de hidrógeno fue disminuyendo y regulándose hasta obtener un valor de 54 ppm. Ver anexo 4.

El pH arrojado en la pantalla LED para este medio fue de 3.6

**Figura 21.**

*pH Arrojado por Arduino en pantalla LED para el medio Hoagland y Arnon II*



*Nota.* Esta figura muestra la imagen de la pantalla LED que se programo por medio de arduino con el sensor de pH para obtener su valor

**B. Datos del prototipo del biorreactor sin incubar con el medio TAP**

En este biorreactor el valor inicial detectado por el sensor de hidrógeno fue de 65 ppm, donde se detectó la presencia del gas con una temperatura de 28°C y humedad de 79 %, este se redujo rápidamente a un valor de 53 ppm junto con la humedad a un 27%. Ver anexo 4.

El pH arrojado en la pantalla LED para este medio fue de 6.6

**Figura 22.**

*pH Arrojado por Arduino en pantalla LED para el medio TAP*



*Nota:* Esta figura muestra la imagen de la pantalla LED que se programo por medio de arduino con el sensor de pH para obtener su valor

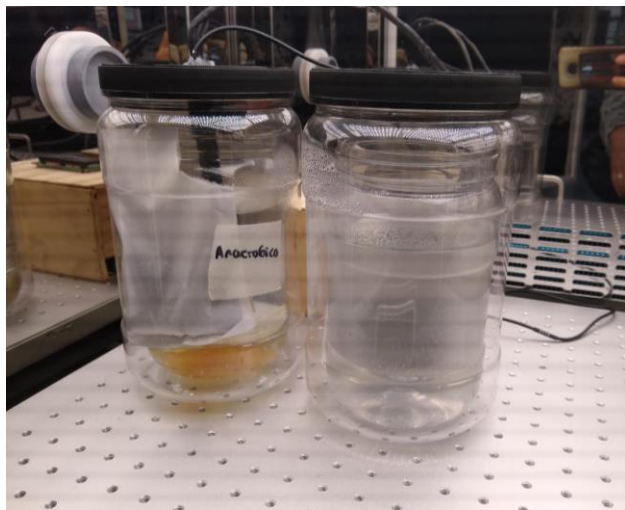


Estos datos indican que los biorreactores sin variables controladas, hay presencia de hidrógeno, sin embargo, hay que tener en cuenta que este valor es por el ambiente y no por la producción a partir de las microalgas.

4.6.1.b Datos obtenidos de los biorreactores productores de hidrógeno. Después del proceso realizado en el punto anterior (4.2.1) los biorreactores se llevaron a la incubadora LED, cambiando las condiciones de temperatura y luz, con un valor de 30°C y 132 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . La incubación duró un tiempo de 90 horas para que produjera el suficiente hidrógeno y poder cuantificarlo. Este tiempo de incubación de 90 horas se ajustó de acuerdo a la información consultada en el artículo de la revista ciencia y sociedad nombrado “POTENCIAL DE ALGAS VERDES PARA LA PRODUCCIÓN FOTOBIOLOGICA DE HIDRÓGENO” en donde las Chlamydomonas generaron hidrógeno al cabo de 72 horas y en un rango de temperatura de 25 a 32 Grados Centígrados.

### **Figura 23.**

*Prototipo de los biorreactores con medios TAP y Hoagland en incubación*



**Nota.** Esta figura muestra la imagen de los dos biorreactores los cuales se encuentran en la incubadora LED después de 90 horas.

Pasadas las 90 horas se procedió a realizar la lectura de los valores arrojados por los sensores, como se realizó anteriormente, pero con la posibilidad de un aumento en la fracción de hidrógeno.

A continuación, se muestra el resumen de los resultados finales de hidrógeno, temperatura, humedad y pH.

### **C. Datos del prototipo del biorreactor incubado después de 90 horas con el medio Hoagland y Arnon II**

El valor inicial detectado por el sensor de hidrógeno fue de 107 ppm con una temperatura de 27°C y un porcentaje de humedad del 36%. La fracción de hidrógeno fue aumentando durante la lectura que se reguló en 7 minutos aproximadamente alcanzando un valor de 112 ppm lo que rectifica que si hubo producción de hidrógeno a una temperatura de 30°C con humedad del 78 %. VER ANEXO 5

El sensor de pH en este medio aumentó con un valor de 4,23.

#### **Figura 24.**

*pH Arrojado por Arduino en pantalla LED para Hoagland y Arnon II después de 90 horas*



*Nota.* Esta figura muestra la imagen de la pantalla LED que se programo por medio de arduino con el sensor de pH para obtener su valor despues de 90 horas cuando hubo produccion de hidrógeno.

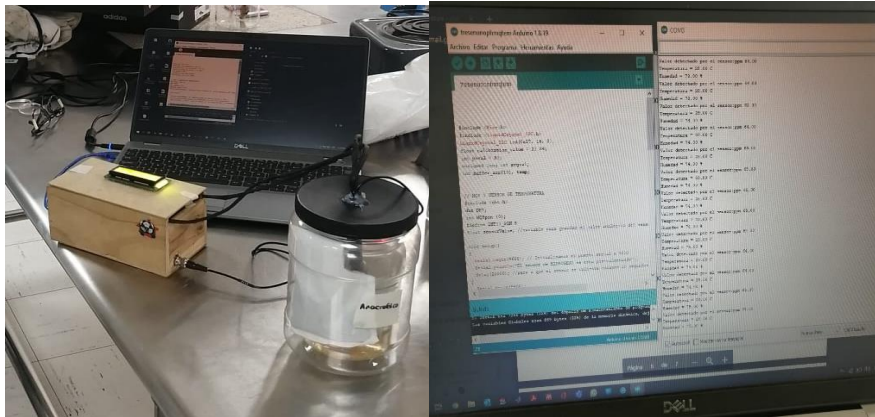
### **D. Datos del prototipo del biorreactor incubado después de 90 horas con el medio TAP**

Para este medio se leyeron los valores iniciales detectado por los sensores, el cual inicio con una concentración de hidrógeno de 123 ppm donde hay presencia de gas con una temperatura de 31° C y un porcentaje de humedad del 73 %, este fue disminuyendo rápidamente hasta llegar a 115 ppm de hidrógeno con una temperatura de 30°C y una humedad del 78%. VER ANEXO 6

El pH de este medio no cambió y continuó siendo neutro con un valor del 6,66.

**Figura 25.**

*Lectura de datos por medio del software de Arduino*



**Nota.** En esta fotografía se muestra cómo se exportan los datos por medio del Cable plug tipo A para Arduino conectado a una computadora que posee el Software de Arduino y su código de programación

Con los resultados obtenidos en este ítem se observó que si hubo incremento en la concentración de hidrógeno y se logró el objetivo principal.

**Tabla 14.**

*Resultados de la lectura de los sensores en el biorreactor con medio Hoagland y Arnon II*

PARÁMETRO	HOAGLAND Y ARNON II SIN INCUBACIÓN	HOAGLAND Y ARNON II CON INCUBACIÓN
Concentración de Hidrogeno	54ppm	112ppm
Temperatura	27°C	30°C
pH	3.6	4.2
Tiempo de incubación	0 horas	90 horas

**Nota.** Esta tabla muestra los valores de los parámetros que se monitorearon con los sensores mediante el software de Arduino

**Tabla 15.**

*Resultados de la lectura de los sensores en el biorreactor con medio TAP*

<b>PARÁMETRO</b>	<b>TAP SIN INCUBACIÓN</b>	<b>TAP CON INCUBACIÓN</b>
<b>Concentración de Hidrogeno</b>	53ppm	115ppm
<b>Temperatura</b>	28°C	30°C
<b>pH</b>	6.6	6.6
<b>Tiempo de incubación</b>	0 horas	90 horas

*Nota.* Esta tabla muestra los valores de los parámetros que se monitorearon con los sensores mediante el software de Arduino

El pH puede variar por la presencia de diferentes microorganismos y por la cantidad de nutrientes adicionados al medio, según el libro “*Microalgas: Cultivo y aplicaciones.*” Las microalgas muestran una clara dependencia respecto al pH del medio de cultivo y diferentes especies varían ampliamente en su respuesta al mismo.

4.6.1.c Recuento de las células en la cámara de Neubauer con la biomasa final que produjo hidrógeno. Después del ítem anterior se procedió a abrir los reactores y tomar pequeñas muestras para analizar si hubo o no incremento celular. Para este recuento se realizó el mismo procedimiento del capítulo anterior mencionado el punto 3.1.3 pero con las muestras que ya produjeron hidrógeno.



**Figura 27.**

*Recuento celular del reactor TAP con producción de hidrogeno*

	116	95	102	82									84	92	88	103	
Promedio A: 100	93	94	110	108									76	100	77	85	Promedio B: 92
	81	95	111	100									93	107	89	87	
	97	105	98	97									87	101	89	87	
Promedio C: 100	101	89	94	111									103	84	96	106	Promedio D: 98
	85	99	115	119									99	81	107	95	
	83	94	99	103									119	117	87	91	
	95	84	116	101									93	109	89	94	

**Nota:** Esta figura muestra el recuento celular por medio de la cámara de Neubauer en el reactor TAP en la cual un promedio de 98 células presentes en 1 mm<sup>2</sup>.

$$C = 9,8 \times 10^5 \text{ células/ml}$$

En la ecuación 5 se muestra la fórmula para hallar la concentración celular de cada recuento, dando como resultado  $7 \times 10^5$  células/ml para el medio Hoagland y Arnon II y  $9,8 \times 10^5$  células/ml para el medio TAP.

**Tabla 16.**

*Resultados de recuento total de cada medio de cultivo*

<b>Resultados del recuento inicial y final de cada medio</b>		
<b>Concentración</b>	<b>Medio Hoagland y Arnon</b>	<b>Medio TAP</b>
Valor Inicial de la concentración total del Medio sin producción de hidrógeno	2,8x10 <sup>5</sup> células/ml	7x10 <sup>5</sup> células/ml
Valor Final de la concentración total del Medio con producción de hidrógeno	4,7x10 <sup>5</sup> células/ml	9,8x10 <sup>5</sup> células/ml

**Nota.** Esta tabla muestra el recuento de células inicial que se realizó con los medios de cultivo inoculados sin adicionar al biorreactor y final con los medios productores de hidrógeno, expresado en células por mililitro

Como se mencionó en el capítulo anterior el recuento de células se hizo en las dos etapas con el fin de comparar si hubo incremento después de 90 horas expuestas a diferentes variables y con un ambiente en su mayoría anaerobio. Teniendo en cuenta los resultados que se muestran en la tabla 14 se evidencia un incremento en la densidad de la biomasa, en el medio Hoagland se pudo observar que hubo un aumento de 1,9x10<sup>5</sup> células/ml y en el medio TAP de igual manera hubo un crecimiento celular de 2,8x10<sup>5</sup> células/ml. Con la obtención de resultados se analiza que la producción de hidrógeno es proporcional a la concentración celular.

Además, es necesario precisar que el prototipo de estos biorreactores cumplió con los requerimientos de diseño necesarios para la producción de hidrógeno: se esterilizaron previamente, su estructura (tubular) y transparencia permitió la transferencia adecuada de luz, además, gracias a la incubadora LED, se pudo realizar un seguimiento de la temperatura lo que permitió comprobar el valor en el que se obtiene el hidrógeno. Por último, la implementación de frascos más pequeño posibilitó la utilización de los sobres de anaerobiosis lo cual es un factor clave para que el metabolismo de las microalgas.

#### **4.7 Diseño conceptual de un fotobiorreactor**

En el diseño conceptual del biorreactor para obtener hidrógeno por el método de fotólisis, se propone implementar un reactor cerrado de polimetilmetacrilato de estructura tubular vertical con la parte superior removible que permita el ingreso de biomasa, la presencia del sensor de pH con el cual se obtienen datos de esta variable y así poder realizar un seguimiento de la misma. Y del

sensor temperatura que permite no solo realizar un seguimiento sino también controlarla por medio de una piscina o duchas de agua. Además, debe ser iluminado por tubos de luz LED de forma vertical, deben estar ubicados equidistante al biorreactor de manera que este pueda ser totalmente abarcado por las ondas de luz.

Otro factor a tener en cuenta para el diseño es la agitación, ya que al tener un reactor de mayor tamaño puede existir precipitación de la biomasa, incluso se pueden generar biopelículas en las paredes, por lo tanto, se debe implementar un agitador magnético que permita la dispersión uniforme de las células microalgales en el medio de cultivo, teniendo en cuenta la velocidad, ya que, si tiene una agitación excesiva, puede originar daños en la estructura celular.

Finalmente se recomienda que para la geometría del biorreactor no solo se tenga en cuenta su forma tubular, sino también su diámetro el cual, en lo posible, no debe ser mayor a 10 cm y su altura no debe superar los 3 m, esto con el fin de que la disponibilidad de luz no se vea reducida.



## 6. CONCLUSIONES

A partir de los análisis experimentales de los medios de cultivo para el crecimiento de biomasa de la especie *Chlamydomona*, el más favorable para el crecimiento, aislamiento y producción de hidrogeno es el medio Hoagland y Arnon II ya que este medio es más fácil y rápido de preparar, además la mayoría de las células presentes que crecieron son de especie *Chlamydomona* en comparación al TAP en el cual crecieron más especies. Por otro lado, en este medio la *Chlamydomona* demostró que no se necesitan mayor cantidad de células para que pueda producir hidrogeno. Cabe mencionar que los reactivos que se utilizaron como fertilizantes y nutrientes para la preparación de TAP son más costosos, una alternativa a esto es la preparación del medio Hoagland.

La etapa de aislamiento es la más importante del proceso, ya que esta permite obtener las colonias puras de la microalga fotoautótrofa de especie *Chlamydomona*, se verificó la pureza de los cultivos observando la morfología de las colonias presentes, así mismo se realizaron pases periódicos con el fin de mantener cultivos jóvenes. Es un proceso extenso en donde no solo se debe buscar la purificación de la colonia, sino que también es importante la asepsia durante todo el desarrollo del aislamiento.

Se evidenció la producción de hidrógeno en ambos medios de cultivo, teniendo como mayor diferencia la cantidad de células, en donde TAP tuvo un incremento de  $2,8 \times 10^5$  células/ml produciendo 62 ppm de biohidrógeno en 90 horas, mientras que el medio Hoagland y Arnon II aumentó  $1,9 \times 10^5$  células/ml en el mismo tiempo obteniendo un valor de 58 ppm de biohidrógeno, esto permite concluir que el crecimiento celular es directamente proporcional a la producción de hidrógeno con la diferencia de que en el medio Hoagland no es necesario tener una gran concentración de *Chlamydomonas* para obtener hidrógeno.

La construcción del prototipo del biorreactor permitió realizar el diseño conceptual de un fotobiorreactor para obtener hidrógeno por el método de fotólisis, combinando los requerimientos de los reactores tubulares, de placa plana y los reactores anulares de triple camisa, ya que estos tienen una alta relación de superficie/volumen.

Al no poder realizar ningún tipo de tinción para un mejor reconocimiento de la microalga *Chlamydomona*, se dificulta confirmar su presencia en los diferentes medios de cultivo, por esto, es necesario llevar a cabo una minuciosa observación en el microscopio y tener en cuenta las imágenes de referencia para realizar una comparación y así verificar que la morfología de los microorganismos observados es la misma.

Teniendo en cuenta que para la producción de hidrógeno debe existir privación de azufre en los medios de cultivo y que esto al mismo tiempo puede ser perjudicial para la nutrición adecuada de las células, se reemplazó el azufre por cloro para así satisfacer este requerimiento nutricional.

Se observó que los factores más importantes para la producción de hidrógeno que se pueden controlar son la temperatura y la intensidad lumínica, en donde la temperatura óptima debe estar cerca a los 30°C y la luz en un valor aproximado de 132  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , teniendo en cuenta esto se confirmó la información consultada en la bibliografía en donde dice que la eficiencia de conversión de luz en hidrógeno disminuye con el aumento de la intensidad de la luz.

Al tener una pequeña cantidad de biomasa, una alta intensidad lumínica puede perjudicar la reproducción de las células del microorganismo, esto se puede comprobar mediante el recuento de células en la cámara de Neubauer, en donde se evidenció un crecimiento celular en el medio de cultivo antes y después de la producción de hidrógeno.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] “Cambio climático,” *Acciona*. [https://www.acciona.com/es/cambio-climatico/?\\_adin=11551547647](https://www.acciona.com/es/cambio-climatico/?_adin=11551547647)
- [2] G. y B. O. Bergkamp, *Los humedales y el cambio climático*. 1999.
- [3] “Uso del hidrogeno como combustible,” *la guia*. <https://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/uso-del-hidrogeno-como-combustible>
- [4] “SIAC,” 2019. <http://www.siac.gov.co/web/siac/emisionesaire?inheritRedirect=true>
- [5] A. E. B. Matiz, “Análisis histórico de los determinantes del precio internacional del petróleo a partir de mediados del siglo XX,” 2017.
- [6] M. G. Romero, “Biocombustibles y producción de biohidrógeno”.
- [7] “Los planes de GEB y Ecopetrol con el hidrógeno,” *OCENSA*, 2022. <https://www.ocensa.com.co/Paginas/Los-planes-de-GEB-y-Ecopetrol-con-el-hidrogeno.aspx>
- [8] “El Grupo Ecopetrol inició la producción de hidrógeno verde en Colombia,” *Ecopetrol*. [https://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/Home/es//wps/portal/Home/es/noticias/detalleNoticias!/ut/p/z0/xZFPu8IwEMW\\_Chx6zCRN-ddjKVIREBwGxV6YkEalhmXJUHQ\\_vUEcBg9y9bZv923m7S84xwuca7aXa-YkaKa8fs5by3vaSsNBI5ySXhSTh5t-SvvtDiVphGfC4juce1NnGibZgITDLJ71SELNg2Z\\_TmPSb](https://www.ecopetrol.com.co/wps/portal/Home/es//wps/portal/Home/es/noticias/detalleNoticias!/ut/p/z0/xZFPu8IwEMW_Chx6zCRN-ddjKVIREBwGxV6YkEalhmXJUHQ_vUEcBg9y9bZv923m7S84xwuca7aXa-YkaKa8fs5by3vaSsNBI5ySXhSTh5t-SvvtDiVphGfC4juce1NnGibZgITDLJ71SELNg2Z_TmPSb)
- [9] P. D. Martínez, “Tecnologías De Producción De Hidrógeno Basadas En Métodos Biológicos,” *Ciemat*, pp. 8–13, 2020, [Online]. Available: <https://www.ciemat.es/portal.do?TR=A&IDR=1&identificador=848>
- [10] J. R. Naturgy, Fundación Morante, T. Andreu, G. García, J. Guilera, A. Tarancón, and M. Torrell, *Hidrógeno, Vector energético de una economía descarbonizada*. 2020.
- [11] J. B. Contreras Pérez, J. A. Scott, G. Espinal, C. L. Mendoza Gómez, and Z. Zapata, “Potencial de algas verdes para la producción fotobiológica de hidrógeno,” *Cienc. Soc.*, vol. 33, no. 3, pp. 307–26, 2008, doi: 10.22206/cys.2008.v33i3.pp307-26.
- [12] A. González Céspedes, “¿Qué Son Las Microalgas?,” *Cajamar ADN Agro*, vol. 011, pp. 1–11, 2015.
- [13] L. Lorena and C. Chicué, “Desarrollo de una ruta estratégica que realciona la proporción carbono nitrogeno (C/N) alimentado al cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* con la calidad

- del biodiesel,” 2016.
- [14] J. K. Cruz Vázquez, H. Chavez Chavez, F. Gumaro Ruiz Ruiz, J. K. Cruz Vázquez, H. Chavez Chavez, and F. Gumaro Ruiz Ruiz, “Diseño de una interfaz gráfica orientada a la simulación de un fermentador,” *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 23, no. 1, pp. 72–82, 2021, doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.90212.
- [15] V. F. Sanz, “Diseño de un fotobiorreactor para la obtención de compuestos bioluminiscentes,” p. 95, 2019, [Online]. Available: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/167711/dise-o-de-un-fotobiorreactor-para-la-obtenci-n-de-biomol-culas-fran-sanz.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [16] L. G. Ramírez Mérida, E. Jacob-Lopes, and L. Queiroz Zepka, “Fotobiorreactor: Herramienta Para Cultivo De Cianobacterias,” *Cienc. y Tecnol.*, vol. 6, no. 2, p. 9, 2014, doi: 10.18779/cyt.v6i2.178.
- [17] F. Group, “Fotobiorreactores 8.1,” pp. 267–290.
- [18] Y. Hun, “Efecto De La Concentración De La Solución Nutritiva Sobre La Biomasa De Microalgas Del Género Chlamydomonas,” p. 45, 2010.
- [19] “TAP Medium,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2006, no. 1, p. pdb.rec560, 2006, doi: 10.1101/pdb.rec560.
- [20] G. Markou and F. Monlau, “Nutrient recycling for sustainable production of algal biofuels,” *Biofuels from Algae*, pp. 109–133, 2019, doi: 10.1016/b978-0-444-64192-2.00006-8.
- [21] D. de Bromatología, “Procedimientos de Microbiología General,” *Pontif. Univ. Chile*, p. 1, 2021, [Online]. Available: <http://www6.uc.cl/manejoheridas/html/antiseptico.html>
- [22] B. O. Arredondo-Vega and D. Voltolina, “Capítulo 2: Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento,” *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación la biomasa microalgal*, no. January, p. 10, 2007, [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/253237563>
- [23] F. Swanny, P. Jérémy, and L. Jack, “Investigation of H<sub>2</sub> production by microalgae in a fully-controlled photobioreactor,” *16th World Hydrog. Energy Conf. 2006, WHEC 2006*, vol. 3, no. June, pp. 1941–1947, 2006.
- [24] D. O. Soluci, F. Molecular, and P. Molecular, “Fichas de información técnica”.
- [25] A. Julio, *et al.*, *Microalgas: Cultivo y aplicaciones*. 1995. doi: 10.17979/spudc.9788497497695.

## GLOSARIO

**Biomasa:** la biomasa es una fuente de energía que presenta gran heterogeneidad estructural anatómica y química, con baja densidad energética, alto contenido de humedad e higroscopicidad es hidrófila y con bajo poder calorífico. Para su aprovechamiento, la aplicación de tratamientos térmicos, conocidos como torrefacción promueven mayor eficiencia en la conversión a biocombustibles.

**Cámara de Neubauer:** la cámara de Neubauer es un dispositivo de precisión hecho de vidrio óptico especial. Se emplea para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. Las cámaras de recuento se utilizan para el análisis de sangre (recuento de leucocitos, eritrocitos, trombocitos). Además, las cámaras de recuento sirven para contar bacterias, espermatozoides y esporas de hongo.

**Colonias microalgales:** las microalgas son, en general, organismos fotoautótrofos, es decir, obtienen la energía de la luz proveniente del sol y se desarrollan a partir de materia inorgánica. Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer empleando materia orgánica como fuente de energía o de carbono.

**Conversión de unidades de luz:**  $1800 \mu\text{mol (m}^2\text{s) a} \equiv 427 \text{ Watts/m}^2$

**Esterilización:** la esterilización es un proceso de apoyo a los procesos dando un correcto funcionamiento para un centro sanitario. Su importancia deriva de que se relaciona tanto con los valores éticos -proteger a los usuarios de infecciones oportunistas- como con los económicos, ya que minimiza los costes de no calidad.

**Fotoperiodo:** se utiliza en el terreno de la biología para denominar el tiempo diario que un ser vivo se expone a la luz. Durante este periodo, se llevan a cabo diversos procesos en el organismo vegetal que permiten la regulación de su funcionamiento biológico.

**Humedal:** los humedales son ecosistemas cuyos suelos aparecen permanente o periódicamente inundados, tanto en ambientes de agua dulce como en aquellos que presentan cierto grado de salinidad. Fueron diseñados por el ser humano y que de forma artificial retienen agua, tanto permanente como temporalmente, adecuándose a las condiciones ambientales.

**Incubadora:** el objetivo principal de la incubadora en el laboratorio es la de almacenar y acondicionar el ambiente, con el fin de desarrollar de manera adecuada los microorganismos,

mediante la temperatura, presión y circulación del aire. Este es un equipo de uso químico, para el análisis de los compuestos de microbiología y el desarrollo de compuestos orgánicos.

**Inoculación:** sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento.

## **ANEXOS**

## **ANEXO 1**

### **RECOMENDACIONES**

En el método de obtención de biohidrógeno partiendo de microalgas fotoautótrofas, se recomienda tomar la mayor precaución para evitar el riesgo de contaminación, ya que este factor puede afectar el tiempo de la fase de crecimiento del microorganismo utilizado, por ende, retrasar la producción de hidrógeno y aumentar los costos de procesamiento.

Al llevar a cabo los fotoperiodos de 12 horas oscuridad y 12 horas luz, se evidenció un cambio de color del medio a uno más verde que indicó el crecimiento de la biomasa presente, por esto se recomienda implementar fotoperiodos donde se ajusten a 6 horas oscuridad y 18 horas luz.

La presencia de otro microorganismo como una bacteria u hongo afecta negativamente la etapa de aislamiento, por lo tanto, si esto ocurre se sugiere repetir el proceso de diluciones que tiene como consecuencia extender el tiempo de purificación, no repetirlo, podría causar la muerte del microorganismo.

Se recomienda realizar un recuento celular para verificar el aumento de la concentración de las células de la especie *Chlamydomonas* y disminuir la intensidad lumínica ya que esta puede afectar en la producción de hidrógeno.

Se recomienda aislar en agar si se va a aislar la especie *Chlamydomona* en el medio TAP, en cuanto al medio Hoagland es más favorable el crecimiento en medio líquido.



## ANEXO 2

### CARACTERÍSTICAS DEL HUMEDAL SANTA MARÍA DEL LAGO

Para el desarrollo de este proyecto se realizó previamente una consulta bibliográfica en donde se encontró que las microalgas se desarrollan en diferentes ambientes acuáticos, como son los ríos, lagos, lagunas, humedales y en general donde exista humedad, incluso en el suelo, lagos salinos y desiertos. A partir de esto se evaluó el humedal Santa María del Lago en Bogotá, se eligió este humedal en específico por su ubicación y facilidad de acceso.

La toma de las muestras se realizará en el Parque Ecológico Distrital de Humedal Santa María del Lago que está localizado al noroccidente de la ciudad dentro de la localidad de Engativá, limita por el norte con el Conjunto Residencial de San Francisco; hacia el oriente con las carreras 74 y 73 y el Conjunto Residencial Sago, por el occidente con la carrera 76 y por el sur con la calle 75.

**Figura 28**

*Mapa de la ubicación del Humedal Santa María del Lago.*



**Nota.** La figura representa el Mapa de la ubicación Humedal Santa María del Lago. Tomado de: “PLAN DE MANEJO AMBIENTAL PED HUMEDAL SANTA MARIA DEL LAGO.” [En línea]. Disponible: [https://www.acueducto.com.co/wps/wcm/connect/EAB2/da0aae63-6df2-4047-b226-b90b7b8f37dd/PMA\\_SantaMariadelLago.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=R OOTWORKSPACE.Z18\\_K862HG82NOTF70QEKDBLFL3000-da0aae63-6df2-4047-b226-b90b7b8f37dd-mJ730tX](https://www.acueducto.com.co/wps/wcm/connect/EAB2/da0aae63-6df2-4047-b226-b90b7b8f37dd/PMA_SantaMariadelLago.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=R OOTWORKSPACE.Z18_K862HG82NOTF70QEKDBLFL3000-da0aae63-6df2-4047-b226-b90b7b8f37dd-mJ730tX)

○

## ○ **Muestreo**

La recolección del agua o el muestreo puede denominarse como una de las etapas más importantes de la metodología, ya que se debe seguir un protocolo de recolección que evita la contaminación excesiva de la muestra y permite que las microalgas puedan ser recolectadas sin morir, además se debe corroborar qué la muestra de agua cuenta con la presencia de los microorganismos con los que se va a realizar la investigación.

- **Protocolo de la toma de muestra:** antes de realizar la recolección de la muestra, se esterilizan los frascos, para esta investigación se utilizaron dos frascos, uno de vidrio y otro de plástico, de boca ancha con tapa de rosca y de 1 litro cada uno. Una vez se tuvieron los frascos esterilizados, se procedió a recolectar el agua del humedal, para esto se usaron guantes estériles y se flameó la boquilla de cada frasco para evitar la contaminación, se tomó una muestra superficial y otra de aproximadamente 30 cm de profundidad.
- Es importante tener en cuenta que la muestra se debe trasladar al laboratorio en un plazo de una a dos horas después de recolectadas con el fin de evitar la muerte de los microorganismos por anoxia o por maltrato físico producto del traslado.[12]

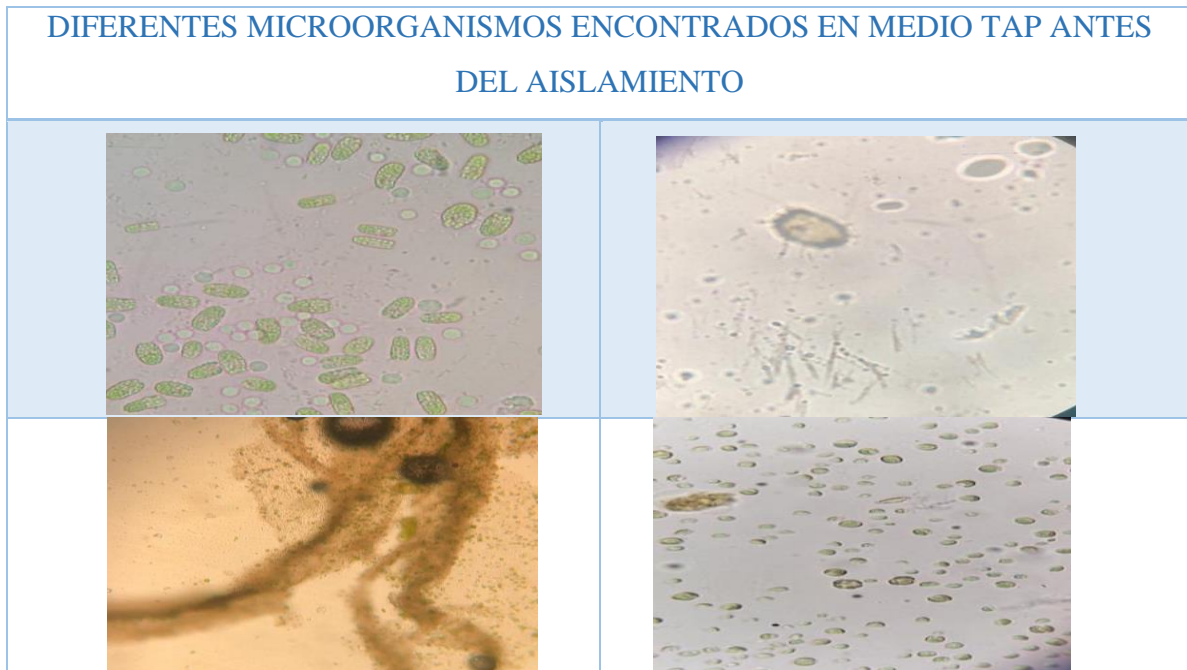
### ANEXO 3

#### COMPARACIÓN DE MICROORGANISMOS

Teniendo en cuenta las imágenes encontradas en “¿Qué Son Las Microalgas?” escrito por A. González Céspedes, se realizó una comparación con las imágenes mostradas a continuación y se encontraron diferentes especies como *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana*, *Spirulina*, En el medio TAP.


**Tabla 17.**

*Imágenes microscópicas de los microorganismos encontrados en medio TAP.*



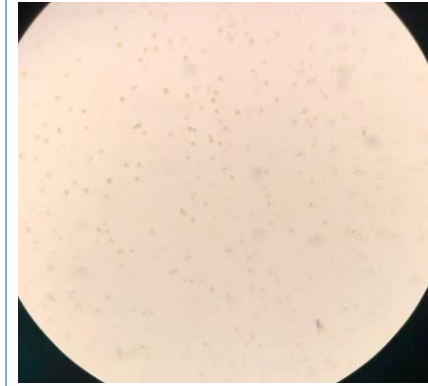
**Nota.** Esta tabla muestra imágenes de los microorganismos encontrados en medio TAP antes de realizar el aislamiento.

## ANEXO 4

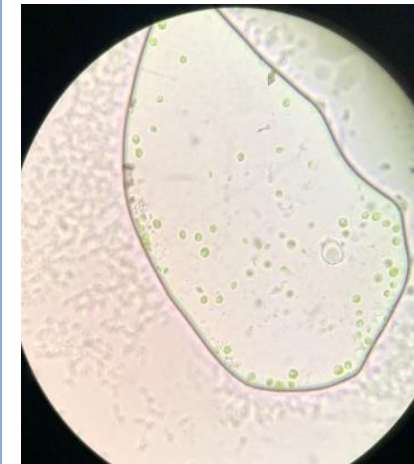
RECONOCIMIENTO DE MICROALGAS AISLADAS			
MEDIO DE CULTIVO	COLONIAS		IMAGEN MICROSCÓPICA
<p style="text-align: center; margin: 0;"><b>Hoagland "No tocar"</b></p> 		<p style="margin: 0;"><b>1</b></p> 	
			<p style="margin: 0;"><b>2</b></p> 
			<p style="margin: 0;"><b>3</b></p>

			
		4	
			
<b>Medio de cultivo</b>	<b>Colonias</b>	1	<b>Imagen microscópica</b>

Hoagland y Arnon II con  
aire

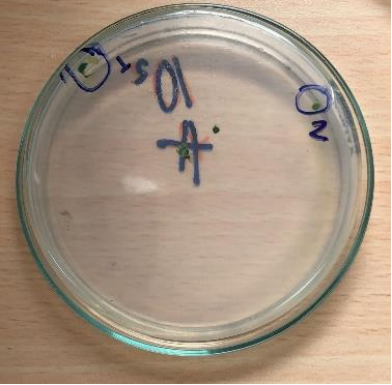
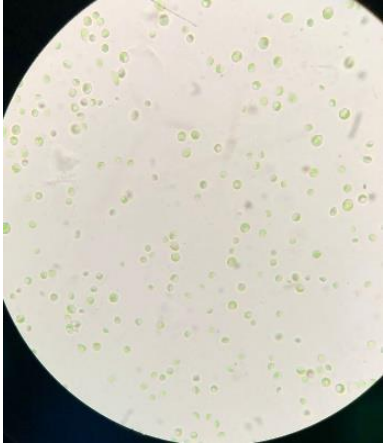
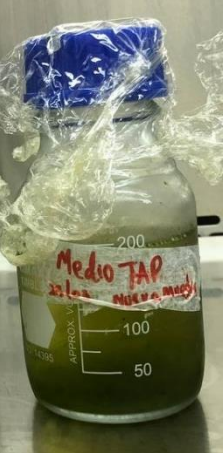
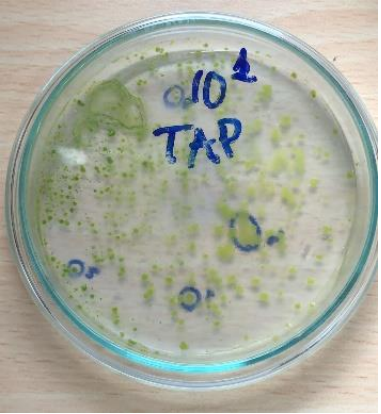

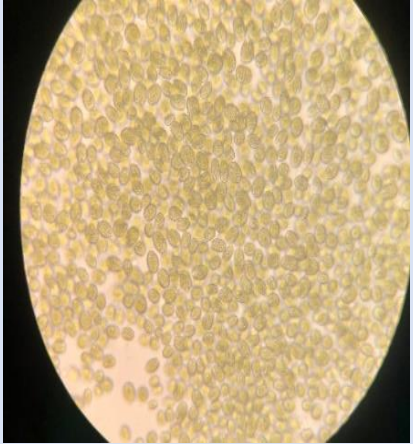


2

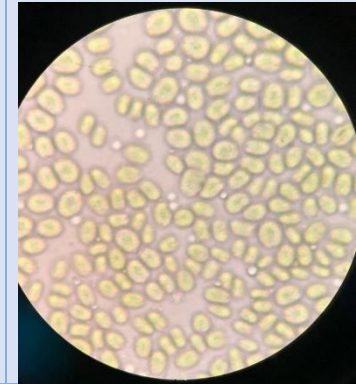
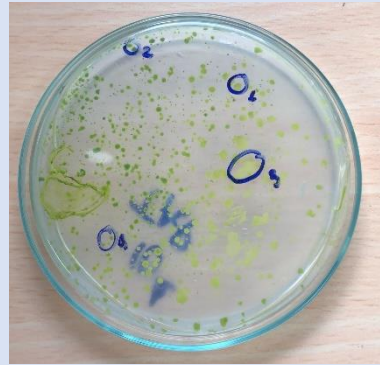


3

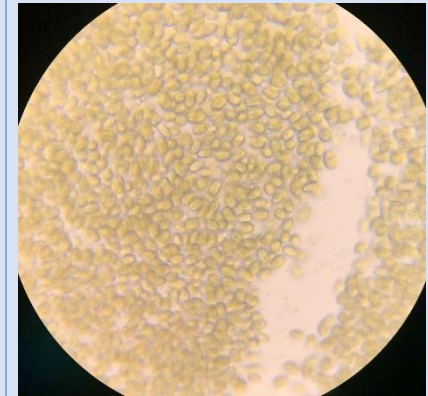
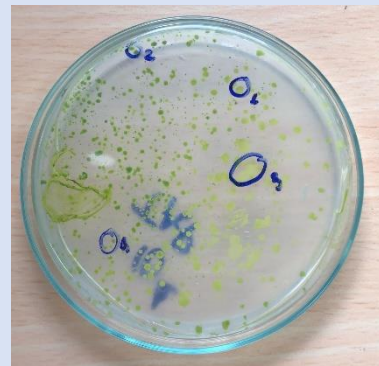
					
1					
2					

			
Medio de cultivo	Colonias	Imagen microscópica	
<p data-bbox="363 732 432 764"><b>TAP</b></p> 		<p data-bbox="1457 737 1478 764">1</p> 	 <p data-bbox="1457 1276 1478 1304">2</p>





3



## ANEXO 5

### CÓDIGO DE PROGRAMACIÓN

```

#include <Wire.h>
#include <LiquidCrystal_I2C.h>
LiquidCrystal_I2C lcd (0x27, 16, 2);
float calibration_value = 21.34;
int phval = A1;
unsigned long int avgval;
int buffer_arr[10], temp;
// MQ8 Y SENSOR DE TEMPERATURA
#include <dht.h>
dht DHT;
int MQ8pin (0);
#define DHT11_PIN 8
float sensorValue; //variable para guardar el
valor analógico del sensor
void setup()
{
  Serial.begin (9600); // Inicializamos el
puerto serial a 9600
  Serial.println ("El sensor de HIDRÓGENO
se está pre-calentando");
  Delay (20000); //pera a que el sensor se
caliente durante 20 segundos para que el
dato leído se establezca
{
  Serial.begin(9600);
  lcd.init();
  lcd.begin(16, 2);
  lcd.backlight();
  lcd.setCursor(0, 0);
  lcd.print(" Bienvenido a ");
  lcd.setCursor(0, 1);
  lcd.print(" Medidor pH ");
  delay(2000);
  lcd.clear();
}
}

void loop()
{
  sensorValue = analogRead(MQ8pin); //
leer entrada analógica "A0"
  Serial.print("Valor detectado por el
sensor:ppm ");
  Serial.print(sensorValue);
  if(sensorValue > 100)
  {
    Serial.print(" | Se ha detectado gas!");
  }
  Serial.println("");
  delay(2000); // espera por 2 segundos para
la siguiente lectura
  {
    DHT.read11(DHT11_PIN);
    Serial.print("Temperatura = ");
    Serial.print(DHT.temperature);
    Serial.println(" C");

    Serial.print("Humedad = ");
    Serial.print(DHT.humidity);
    Serial.println(" %");
    delay(2000);
  }
  {
    for (int i = 0; i < 10; i++)
    {
      buffer_arr[i] = analogRead(A1);
      delay(30);
    }
    for (int i = 0; i < 9; i++)
    {
      for (int j = i + 1; j < 10; j++)
      {
        if (buffer_arr[i] > buffer_arr[j])
        {
          temp = buffer_arr[i];
          buffer_arr[i] = buffer_arr[j];
          buffer_arr[j] = temp;
        }
      }
    }
  }
  avgval = 0;
  for (int i = 2; i < 8; i++)
    avgval += buffer_arr[i];
  float volt = (float)avgval * 5.0 / 1024 / 6;
  float ph_act = -5.70 * volt +
calibration_value;

```

```

lcd.setCursor(0, 0);
lcd.print("pH Val:");
lcd.setCursor(8, 0);
lcd.print(ph_act);

delay(1000);
}
}

```

### Resultados Arduino de Medio Hoagland y Arnon sin incubar

sensor de HIDRÓGENO se está pre-calentando	Temperatura = 27.00 C
Valor detectado por el sensor: ppm 56.00	Humedad = 23.00 %
Temperatura = 27.00 C	Valor detectado por el sensor: ppm 53.00
Humedad = 23.00 %	Temperatura = 27.00 C
Valor detectado por el sensor: ppm 54.00	Humedad = 24.00 %
Temperatura = 27.00 C	Valor detectado por el sensor: ppm 52.00
Humedad = 24.00 %	Temperatura = 27.00 C
Valor detectado por el sensor: ppm 54.00	Humedad = 23.00 %
Temperatura = 27.00 C	Valor detectado por el sensor: ppm 52.00
Humedad = 24.00 %	Temperatura = 27.00 C
Valor detectado por el sensor: ppm 53.00	Humedad = 23.00 %
Temperatura = 27.00 C	Valor detectado por el sensor: ppm 53.00
Humedad = 24.00 %	Temperatura = 27.00 C
Valor detectado por el sensor: ppm 53.00	Humedad = 24.00 %
Temperatura = 27.00 C	Valor detectado por el sensor: ppm 54.00
Humedad = 24.00 %	Temperatura = 27.00 C
Valor detectado por el sensor: ppm 53.00	Humedad = 23.00 %
Temperatura = 27.00 C	Valor detectado por el sensor: ppm 54.00
Humedad = 24.00 %	Temperatura = 27.00 C
Valor detectado por el sensor: ppm 52.00	Humedad = 23.00 %
Temperatura = 27.00 C	Valor detectado por el sensor: ppm 54.00
Humedad = 24.00 %	Temperatura = 27.00 C
Valor detectado por el sensor: ppm 52.00	Humedad = 23.00 %
Temperatura = 27.00 C	Valor detectado por el sensor: ppm 54.00
Humedad = 23.00 %	Temperatura = 27.00 C
Valor detectado por el sensor: ppm 51.00	Humedad = 23.00 %

### Resultados Arduino TAP sin incubar

El sensor de HIDRÓGENO se está precalentando	Humedad = 73.00 %
Valor detectado por el sensor: ppm 65.00	Valor detectado por el sensor: ppm 56.00
Temperatura = 28.00 C	Temperatura = 28.00 C
Humedad = 79.00 %	Humedad = 63.00 %
Valor detectado por el sensor: ppm 56.00	Valor detectado por el sensor: ppm 64.00
Temperatura = 28.00 C	Temperatura = 28.00 C
	Humedad = 53.00 %

Valor detectado por el sensor: ppm 64.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 46.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 58.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 40.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 56.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 35.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 68.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 34.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 66.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 32.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 66.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 31.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 60.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 29.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 56.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 30.00 %

Valor detectado por el sensor: ppm 58.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 28.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 62.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 26.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 57.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 25.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 55.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 24.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 53.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 27.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 53.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 27.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 53.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 27.00 %  
Valor detectado por el sensor: ppm 53.00  
Temperatura = 28.00 C  
Humedad = 27.00 %

## ANEXO 6

### RESULTADOS OBTENIDOS DEL PROTOTIPO DEL BIORREACTOR INCUBADO DESPUÉS DE 90 HORAS CON EL MEDIO HOAGLAND Y ARNON II

Valor detectado por el sensor:ppm 107.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 27.00 C Humedad = 36.00 %	Temperatura = 28.00 C Humedad = 76.00 %
Valor detectado por el sensor:ppm 118.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 27.00 C Humedad = 52.00 %	Valor detectado por el sensor:ppm 124.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 28.00 C Humedad = 78.00 %
Valor detectado por el sensor:ppm 121.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 27.00 C Humedad = 60.00 %	Valor detectado por el sensor:ppm 125.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 28.00 C Humedad = 78.00 %
Valor detectado por el sensor:ppm 123.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 27.00 C Humedad = 64.00 %	Valor detectado por el sensor:ppm 125.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 28.00 C Humedad = 79.00 %
Valor detectado por el sensor:ppm 124.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 27.00 C Humedad = 69.00 %	Valor detectado por el sensor:ppm 125.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 28.00 C Humedad = 80.00 %
Valor detectado por el sensor:ppm 124.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 27.00 C Humedad = 72.00 %	Valor detectado por el sensor:ppm 125.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 28.00 C Humedad = 80.00 %
Valor detectado por el sensor:ppm 125.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 27.00 C Humedad = 73.00 %	Valor detectado por el sensor:ppm 124.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 28.00 C Humedad = 81.00 %
Valor detectado por el sensor:ppm 126.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 27.00 C Humedad = 74.00 %	Valor detectado por el sensor:ppm 123.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 28.00 C Humedad = 81.00 %
Valor detectado por el sensor:ppm 126.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 28.00 C Humedad = 75.00 %	Valor detectado por el sensor:ppm 121.00   Se ha detectado gas! Temperatura = 28.00 C Humedad = 81.00 %
Valor detectado por el sensor:ppm 125.00   Se ha detectado gas!	





Humedad = 78.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 112.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 30.00 C

Humedad = 78.00 %

### **Resultados obtenidos del prototipo del biorreactor incubado después de 90 horas con el medio TAP**

El sensor de HIDRÓGENO se está pre-calentando  
Valor detectado por el sensor:ppm 123.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 31.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 122.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 31.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 122.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 31.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 121.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 31.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 120.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 31.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 120.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 119.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 118.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 73.00 %

Valor detectado por el sensor:ppm 118.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 117.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 117.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 116.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 116.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 73.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 115.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 72.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 114.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 72.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 114.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 72.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 114.00 |  
Se ha detectado gas!





Humedad = 72.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 114.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 72.00 %  
Valor detectado por el sensor:ppm 115.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 72.00 %

Valor detectado por el sensor:ppm 115.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 72.00 %  
  
Valor detectado por el sensor:ppm 115.00 |  
Se ha detectado gas!  
Temperatura = 32.00 C  
Humedad = 72.00 %