



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**Evaluación de las Condiciones de Cultivo Autotrófico de  
Microalgas *Chlorella* para la Producción de Biodiesel**

**Ana Gabriela Dávila Gavilanes**

**Valeria Ochoa-Herrera, Ph.D., Directora de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniero  
en Ambiental

Quito, Mayo del 2013

**Universidad San Francisco de Quito  
Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Evaluación de las Condiciones de Cultivo Autotrófico de  
Microalgas *Chlorella* para la Producción de Biodiesel**

**Ana Gabriela Dávila Gavilanes**

Valeria Ochoa-Herrera, Ph.D.  
Directora de Tesis y  
Miembro del Comité de Tesis.....

Ródny Peñafiel, Dr. ....  
Coordinador de Ingeniería Ambiental  
y Miembro del Comité de Tesis

René Parra, Ph.D. ....  
Miembro del Comité de Tesis

Ximena Córdova, Ph.D. ....  
Decana del Colegio de Ciencias e  
Ingeniería

Quito, Mayo del 2013

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

-----

Nombre: Ana Gabriela Dávila G.

C. I.: 172148816-9

Fecha: Mayo, 2013.

## RESUMEN

El desarrollo de energías renovables es de gran interés a nivel mundial, éstas además de permitir ampliar la matriz energética, reducen el uso de combustibles fósiles y sus impactos socio-ambientales. Los biocombustibles son un tipo de energía renovable que se generan a partir de biomasa, dentro de ellos se encuentra el biodiesel que es un combustible biodegradable, renovable y no tóxico que se puede producir a partir de los lípidos que se encuentran en las células de las microalgas, los cuales una vez que son extraídos son sometidos a un proceso de transesterificación obteniendo como producto final el biodiesel. Las ventajas de la producción de biodiesel a partir de microalgas es que éstas no requieren grandes extensiones de tierra para ser cultivadas y el biodiesel generado cuenta con una densidad energética similar al diésel de petróleo. En este proyecto de investigación se evaluaron las condiciones de cultivo autotróficas adecuadas para maximizar el contenido de lípidos en microalgas *Chlorella* bajo condiciones de operación batch y semicontinuas. En una primera fase del proyecto de investigación, las microalgas fueron fortalecidas con medio con fertilizante y cultivadas en medio de proteosa. Como resultado de esta fase se obtuvo microalgas en buenas condiciones aptas para ser utilizadas en experimentos. El efecto en la concentración de biomasa y contenido de lípidos con concentraciones de bicarbonato de sodio en rangos bajos y altos, tiempos de cosecha y efectividad de la agitación fueron evaluados en bioensayos batch. Los resultados revelaron que la concentración de bicarbonato de sodio adecuada fue  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  con un tiempo de cosecha de 4 días en agitador magnético, generando una producción de lípidos de 11,03%. No se estableció una tendencia clara con respecto a la técnica adecuada de agitación, por lo que se decidió realizar los demás experimentos con un agitador orbital. Del mismo modo se realizaron bioensayos en modo de operación semicontinuo con diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio y distintas frecuencias de extracción de lípidos, extracciones periódicas en base a la fase de crecimiento exponencial y una única extracción al finalizar el bioensayo. El mayor porcentaje de lípidos, 6,89%, fue obtenido en el bioensayo con una concentración de bicarbonato de sodio de  $0,10 \text{ g L}^{-1}$ . Los porcentajes de lípidos obtenidos mediante extracción periódica, 6,89%, y extracción única, 6,38%, fueron muy similares por lo que se recomienda realizar una única extracción al culminar el bioensayo con el fin de optimizar recursos. Finalmente, se diseñó el proceso de instalación y operación del fotobiorreactor tubular para el cultivo autotrófico de microalgas *Chlorella* en base al suministro de la fuente de carbono, iluminación, mezclado, monitoreos y eliminación del oxígeno en forma de gas dentro del fotobiorreactor.

## ABSTRACT

Renewable energies are energies of great interest around the world. They allow expanding the world's energy matrix and permit to reduce the use of fossil fuels, reducing the impact of them on the environment and the economy. There are different types of renewable energies such as wind, geothermal, hydro, biofuels, among others. Biofuels are renewable energies that use biomass to generate energy; one of them is the biodiesel, which is a biodegradable, renewable and non-toxic fuel, made from monoalkyl esters of long chain fatty acids that can come from the lipids found in the microalgae cells. Lipids are extracted from microalgae using organic solvents and then with transesterification biodiesel is produced. The lipid content in microalgae can be incremented by optimizing the growing conditions. The advantages of biodiesel generated from microalgae over other biofuels are that they do not require large areas of land for their cultivation and biodiesel generated has an energy density similar to petroleum diesel. In this research project autotrophic culture conditions are evaluated, under batch and semibatch bioassays, in order to find the best conditions and maximize the lipid content in microalgae *Chlorella*. In the first phase of this research project, microalgae were harvested with fertilizer medium and cultured in proteose medium. The result was that the microalgae were in good conditions for using them in experiments. The effects of different sodium bicarbonate concentrations, higher concentrations and lower concentrations, cultivation periods, and the effectiveness of stirring on biomass production and lipid content were tested in batch and semibatch bioassays. The results revealed that the adequate sodium bicarbonate concentration was  $0.10 \text{ g L}^{-1}$  with a cultivation period of four days at magnetic stirrer, producing a lipid content of 11.03%. However, it couldn't be established which stirring technique was the best; therefore the other experiments in this research were conducted by stirring with an orbital shaker. Bioassays were performed under semibatch conditions with different sodium bicarbonate concentrations and lipid extraction frequencies: periodic extractions, whenever microalgae finished their exponential growth phase, and a single extraction at the end of the bioassay. The highest lipid content, 6.89%, was found in the semibatch bioassay with a sodium bicarbonate concentration of  $0.1 \text{ g L}^{-1}$ . However, the percentage of lipids by periodic extractions, 6.89%, and by a unique extraction, 6.38% were very similar so it is recommended doing only a single extraction at the end of the bioassay in order to save resources. Finally, the installation and operation of the tubular photobioreactor was designed for autotrophic cultivation of microalgae *Chlorella*. The design of the installation and operation of the photobioreactor included criteria such as the supply of the carbon source, lighting, mixing, monitoring and removal of oxygen in gas form in the photobioreactor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Valeria Ochoa, directora de esta tesis, por su apoyo profesional e incondicional durante todo el proyecto de investigación, por el esfuerzo brindado para la obtención de material y por su paciencia a lo largo de la investigación.

A Ródney Peñafiel y René Parra, por su buena disposición, constante colaboración y conocimientos impartidos a lo largo de mis años universitarios.

A Sarah Dischinger, por su amistad, su colaboración constante y desinteresada, la cual fue fundamental para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Biotecnología y de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, por amablemente permitirme utilizar sus equipos.

A mi familia y amigos, los cuales permiten que día a día continúe alcanzando mis metas; por su apoyo, consejos y momentos compartidos. En este proyecto les agradezco mucho por motivarme siempre a seguir adelante.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>Resumen .....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>6</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>7</b>
<b>Lista de Tablas .....</b>	<b>10</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>14</b>
1.1 Biodiesel.....	22
1.2 Estanques y Fotobiorreactores.....	35
<b>2. Justificación .....</b>	<b>39</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>42</b>
3.1 General .....	42
3.2 Objetivos Específicos .....	42
<b>4. Materiales y Métodos .....</b>	<b>43</b>
4.1 Reactivos .....	43
4.2 Microalgas .....	43
4.3 Medio de Cultivo.....	44
4.3.1 Medio de Proteosa .....	44
4.3.2 Medio con Fertilizante .....	44
4.4 Crecimiento de Microalgas .....	45
4.5 Transferencia de Microalgas a Medio de Cultivo Fresco.....	47
4.6 Cultivo Autotrófico de Microalgas.....	50
4.7 Bioensayos en Modo de Operación Batch .....	50
4.8 Bioensayos en Modo de operación semicontinuo .....	51
4.9 Diseño del Proceso de Instalación y Operación de un Fotobiorreactor Tubular...	53
4.10 Métodos Analíticos.....	53
4.10.1 Medición de la Concentración de Biomasa de Microalgas.....	53
4.10.2 Extracción de Lípidos. ....	54
<b>5. Resultados y Discusión.....</b>	<b>57</b>
5.1 Crecimiento de Microalgas .....	57
5.2 Cultivo Autotrófico de Microalgas en Bioensayos en Modo de Operación Batch	70
5.3 Cultivo Autotrófico de Microalgas en Bioensayos en Modo de Operación Semicontinuo .....	89
5.4 Diseño del Proceso de Instalación y Operación de un Fotobiorreactor Tubular...	95
5.4.1 Instalación.....	98

5.4.2	Suministro de Fuente de Carbono. ....	99
5.4.3	Provisión de Luz. ....	99
5.4.4	Mezclado. ....	100
5.4.5	Control de temperatura. ....	103
5.4.6	Control del crecimiento celular. ....	103
5.4.7	Control de la concentración de biomasa y contenido de lípidos. ....	104
5.4.8	Eliminación del oxígeno en forma de gas. ....	104
<b>6.</b>	<b>Conclusión.....</b>	<b>105</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>106</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>112</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades de combustibles. Composición química, composición en fórmula, temperatura de ebullición, densidad másica, densidad energética y aplicaciones del biodiesel de primera o segunda generación, etanol, diésel sintético, hidrógeno y diésel de petróleo. Fuente: Posten y Schaub (Posten & Schaub, 2009). .....	24
<b>Tabla 2.</b> Comparación del área requerida para producción de biodiesel a partir de diversos aceites de plantas. Fuente: Tanner (Tanner, 2009). .....	33
<b>Tabla 3.</b> Evaluación preliminar de la influencia del tiempo de cultivo y concentración de bicarbonato de sodio en la concentración de biomasa y contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. Bioensayos batch realizados a 25°C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y tiempo de cultivo de 6, 14 y 26 días, utilizando 50 mL de la cepa USA1+F en 200 mL de medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de 8 y 43,39 g L <sup>-1</sup> . .....	73
<b>Tabla 4.</b> Evaluación de la efectividad del tiempo de cultivo y concentración de bicarbonato de sodio en rangos menores en la concentración de biomasa y contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. Bioensayos batch realizados a 25°C, con ciclos de luz y de oscuridad de 12 horas y tiempo de cultivo 4 y 6 días, utilizando 50 mL de cepa pura USA1+F en 200 mL de medio de cultivo de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio entre 0,05 y 8,00 g L <sup>-1</sup> . .....	77
<b>Tabla 5.</b> Evaluación de la efectividad de agitación manual, realizada una vez al día, y agitación con barra magnética (Agitador Magnético HI301N, Hanna Instruments Inc., U.S.A) a una velocidad de 280 rpm en el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. Bioensayos batch realizados a 25°C, ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y tiempo de cultivo de 4 días, utilizando 100 mL de cepa pura USA1+F en 200 mL de medio de cultivo de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de 0,00; 0,10; 1,00 y 10,00 g L <sup>-1</sup> . .....	83
<b>Tabla 6.</b> Evaluación de la efectividad de agitación con agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) en el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. Bioensayos batch realizados a 25°C, ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y tiempo de cultivo de 4 días, utilizando 50 mL de la cepa USA2 en 200 mL de medio de cultivo de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de 0,00; 0,10 y 10,00 g L <sup>-1</sup> . .....	88
<b>Tabla 7.</b> Absorbancia final registrada, concentración de biomasa y contenido de lípidos en experimentos realizados bajo condiciones de operación semicontinuas a 25°C, con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y agitación con agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) en medio de proteosa con diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio. ....	94

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Descripción general del proceso mediante el cual se obtienen biocombustibles a partir de biomasa vegetal. Fuente: Posten y Schaub (Posten & Schaub, 2009). ..... 19
- Figura 2.** Obtención de biocombustibles a partir de microalgas: biodiesel, bioetanol, biogás. Fuente: Posten y Schaub (Posten & Schaub, 2009). ..... 25
- Figura 3.** Sistemas de fotobiorreactores: platos, tubular, anular y platos con flujo de aire. Fuente: Schenk y colaboradores (Schenk, y otros, 2008). ..... 37
- Figura 4.** Sistema de biorreactor cerrado. El fotobiorreactor cerrado más largo del mundo en Klötze, Alemania, 700 m<sup>3</sup> están distribuidos en 500 km de tubos y producen hasta 100 toneladas de microalgas por año. Fuente: Schenk y colaboradores (2008). ..... 38
- Figura 5.** Fotografía de cambio a medio fresco (medio de proteosa) de cepa USA2. Microalgas sedimentadas en el fondo del erlenmeyer (color verde oscuro) (Fotografía por Ana Gabriela Dávila). ..... 49
- Figura 6.** Curvas de crecimiento de población algal para cepas de microalgas cultivadas en medio de proteosa en un periodo de nueve días a 25°C, con un periodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y con agitación manual una vez al día. A) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 600 nm. B) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 680 nm. C) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 750 nm. Leyenda: (—●—) Nativa, (—■—) EEUU, (—▲—) USA 1, (—✖—) USA1+F, (—◆—) USA 2. .... 61
- Figura 7.** Curvas de crecimiento de población algal para cepas de microalgas puras construidas a partir de mediciones de absorbancia de 600 nm. Microalgas cultivadas en 25°C, en un periodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad y con agitación manual una vez al día. A) Curvas de crecimiento de población algal de microalgas no saludables en medio de proteosa. B) Curvas de crecimiento de población algal de microalgas saludables, fortalecidas con medio con fertilizante. Leyenda: (—●—) Nativa, (—■—) EEUU, (—▲—) USA 1, (—✖—) USA1+F, (—◆—) USA 2. .... 64
- Figura 8.** Determinación de fase estacionaria en curvas de crecimiento de población algal para cepas de microalgas cultivadas en medio de proteosa en condiciones de temperatura de 25°C, en un periodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad y con agitación manual una vez al día. A) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 600 nm. B) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 680 nm. C) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 750 nm. Leyenda: (—●—) Nativa, (—■—) EEUU, (—▲—) USA 1, (—✖—) USA1+F, (—◆—) USA 2. .... 66
- Figura 9.** Evaluación de la concentración de biomasa y porcentaje de lípidos de la cepa pura USA1+F. Curvas de crecimiento de población algal cultivada en medio de proteosa en

condiciones de temperatura de 25°C, en un periodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad y con agitación manual una vez al día. A) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 600 nm. B) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 680 nm. C) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 750 nm. Leyenda: (—\*) USA1+F. .... 69

**Figura 10.** Fotografía de lípidos extraídos de experimentos batch para evaluación de efectividad de tiempo de cultivo (4 y 6 días) y concentración de bicarbonato de sodio en la concentración de biomasa y contenido de lípidos. Experimentos con concentraciones de bicarbonato de sodio (de izquierda a derecha): 0,10; 0,50; 5,00; 8,00 g L<sup>-1</sup> (Fotografía tomada por Ana Gabriela Dávila). .... 76

**Figura 11.** Fotografía de bioensayos batch para evaluar la efectividad de la agitación manual y la agitación con barra magnética en el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. En la parte frontal se observan los experimentos con agitación manual una vez al día y en la parte posterior los experimentos con agitación con barra magnética (Agitador Magnético HI301N, Hanna Instruments Inc., U.S.A) a una velocidad de 280 rpm. Los bioensayos se mantuvieron a una temperatura de 25°C, con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y un tiempo de cultivo de cuatro días. Los experimentos fueron realizados con 100 mL de la cepa USA1+F y alimentados con 200 mL de medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio (de izquierda a derecha): 0 (control), 0,10; 1,00 y 10,00 g L<sup>-1</sup>. (Fotografía tomada por Ana Gabriela Dávila). .... 80

**Figura 12.** Fotografía de bioensayos para evaluar la efectividad de agitación con agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) en el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. En la parte superior izquierda se presenta el agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) con las lámparas OSRAM de luz fluorescente blanca fría como fuente de luz para el crecimiento de las microalgas. En la parte superior derecha se observan los erlenmeyers cubiertos con tapas de esponja y con las microalgas dentro del agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A). En la parte inferior se muestra una fotografía superior del bioensayo. Los bioensayos se mantuvieron a una temperatura de 25°C, ciclo de luz de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y un tiempo de cultivo de 6 días. Los experimentos fueron realizados con 50 mL de cepa USA2 y alimentados con 200 mL de medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de: 0,00 (control), 0,10 y 10,00 g L<sup>-1</sup> (Fotografía tomada por: Ana Gabriela Dávila). 85

**Figura 13.** Monitoreo de absorbancias en longitud de onda de 600 nm para experimentos semicontinuos temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y agitación en agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A). A) Experimento SM1 con concentración de bicarbonato de sodio en medio de proteosa de 0,1 g L<sup>-1</sup> y extracciones de lípidos periódicas. B) Experimento SM2 con concentración de bicarbonato de sodio en medio de proteosa de 0,1 g L<sup>-1</sup> y extracción de lípidos final. C) Experimento SM3 con concentración de bicarbonato de sodio en medio de proteosa de 1 g L<sup>-1</sup> y extracción de lípidos final. Leyenda: (■) mediciones de absorbancias, las líneas verticales indican los días en los que se tomaron 200 mL de muestra para extracción de lípidos en el

caso del experimento SM1 y los días en los que se agregaron 400 mL de medio de cultivo fresco en todos los experimentos (SM1, SM2 y SM3)..... 91

**Figura 14.** Representación del fotobiorreactor diseñado por el Dr.-Ing. Ródney Peñafiel. En la parte superior se observa una representación en 3d del fotobiorreactor y en la parte inferior una representación frontal (izquierda) y una representación de su parte superior (derecha). Representación realizada por Francisco Lara y Ana Gabriela Dávila utilizando el programa para diseño 3ds MAX de Autodesk. .... 97

**Figura 15.** Bombeo de aire desde la parte inferior del fotobiorreactor diseñado por el Dr.-Ing. Ródney Peñafiel con una bomba de aire. Movimiento de las microalgas desde la zona de oscuridad (interior) a la zona fótica (superficie) (Representación realizada por Francisco Lara y Ana Gabriela Dávila). .... 102

## 1. INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles han dominado el sistema energético mundial, siendo la fuente principal para generación de energía para industrias, calefacción y transporte, entre otras (United Nations. United Nations Conference on Trade and Development., 2010). En el 2010 la matriz energética mundial estuvo compuesta de la siguiente manera: 32,4% de petróleo, 27,3% de carbón, 21,4% de gas natural, 10,0% de biocombustibles y residuos, 5,7% de energía nuclear, 2,3% de energía hidroeléctrica y 0,9% de otras fuentes de energía como geotérmica, solar, eólica, etc. (International Energy Agency, 2012). Los combustibles fósiles equivalen a aproximadamente el 80% de la fuente de energía primaria de la matriz energética (World Energy Council, 2010), y los más conocidos son el carbón y el petróleo, siendo el primero el más abundante y económico (World Energy Council, 2010). De acuerdo a las proyecciones mundiales, se prevé un incremento de la demanda de estos combustibles en un 68% para el año 2050 en caso de que no se tomen políticas adecuadas para reducir su consumo (World Energy Council, 2011). A partir de la crisis del petróleo en 1973, los gobiernos, tanto de países desarrollados como en vías de desarrollo, se han visto en la obligación de ampliar su matriz energética (United Nations. United Nations Conference on Trade and Development., 2010). De hecho, en la actualidad se ha establecido que la utilización de combustibles fósiles, como la principal fuente de generación de energía, es insostenible, no solo porque las reservas de este recurso no renovable han disminuido a nivel mundial, sino también porque durante la quema de estos combustibles se emiten gases contaminantes (Christi, 2007).

El desarrollo de energías renovables representa una alternativa que permite diversificar la matriz energética y disminuir la contaminación ambiental (Yang, Xu, Zhang, Hu, Sommerfeld, & Chen, 2010). Con este fin por lo menos 118 países alrededor del

mundo han direccionado recursos y esfuerzos hacia la producción y uso de energías renovables (World Energy Council, 2010), fomentando la producción y consumo de las mismas. En Alemania, líder en implementación de energías renovables en Europa, las energías renovables proveyeron en el 2011 del 12,2% de energía para consumo final, del 20% para generación de electricidad, del 10,4% para calefacción y del 5,6% para combustible para transporte (exceptuando el transporte aéreo). En América Latina, debido al incremento en el precio del petróleo, se han desarrollado proyectos para generación de energía a través de sistemas de paneles solares caseros (SHS: Solar Home Systems) con el fin de producir 2.600 kW en Bolivia, 110 kW en Ecuador, 215 kW en Nicaragua, 250 kW en Honduras, 1.500 kW en Perú y 2.843 kW en Argentina, enfocando estos proyectos en las zonas rurales en las cuales aproximadamente el 28% de la población no cuenta con energía eléctrica (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century, 2012).

Dentro de las energías renovables, los biocombustibles han recibido especial atención, debido a su versatilidad y aplicación, por ejemplo en el sector del transporte los biocombustibles se han utilizado en forma gaseosa o líquida. De hecho los biocombustibles líquidos suplieron el 3% de la demanda mundial de combustibles para transporte terrestre en el 2011 (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century, 2012) y según estadísticas del Consejo de Energía Mundial (World Energy Council) los biocombustibles contribuirán para satisfacer la demanda de combustibles para el transporte en el futuro, incrementando su uso cuatro veces más en el año 2050 comparado con lo que se utilizó en el año 2011 (World Energy Council, 2011). Sin embargo, en términos generales, la producción de energías renovables no ha podido satisfacer aún la demanda actual, este hecho se puede evidenciar a través de la producción de aceite de petróleo que fue de 86,79 mb/den el 2010, mientras que la producción de biodiesel para el mismo año apenas fue de

1,86 mb/d (Administration, 2010); lo que demuestra la importancia de realizar proyectos de investigación y desarrollo para optimizar la producción de biocombustibles. Diferentes países alrededor del mundo han establecido metas claras para promover la producción de biocombustibles. Por ejemplo, para el transporte, Estados Unidos se ha propuesto alcanzar, hasta el 2022, una producción de 130 millones de litros por año de biocombustibles, destinados para transporte (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century). Del mismo modo, la Unión Europea se ha propuesto suplir un 10% de la demanda de combustibles para transporte con biocombustibles para el 2020 (World Energy Council, 2010).

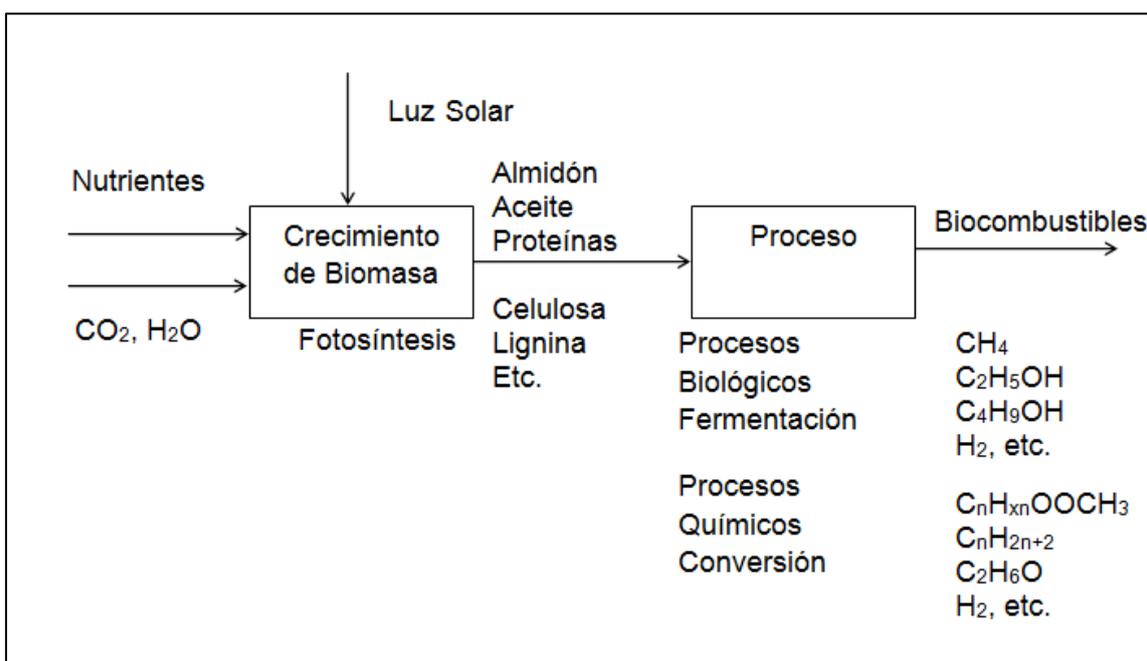
Los biocombustibles permiten ampliar la matriz energética, a través de fuentes renovables, disminuyendo el uso de combustibles fósiles y reduciendo las emisiones producidas por la quema de éstos. Más allá, los biocombustibles pueden ser generados a partir de diversos cultivos tales como cultivos de maíz, palma, piñón, permitiendo el desarrollo de zonas rurales o pueden ser generados a partir de residuos, disminuyendo el impacto ambiental por la disposición final de éstos. Otra ventaja es que los biocombustibles permiten disminuir la dependencia en el petróleo, reduciendo la inestabilidad económica de muchos países por la fluctuación en el precio de éste. Sin embargo, se debe realizar un análisis de ciclo de vida de cada biocombustible con el fin de determinar su impacto ambiental neto y evaluar su aplicación, porque no todos los biocombustibles resultan ser beneficiosos. Por ejemplo, los biocombustibles generados a partir de cultivos ponen en riesgo la seguridad alimentaria de la población y pueden perjudicar la calidad del suelo y los ecosistemas, si no se manejan bajo los estándares y políticas ambientales adecuados (Ochoa-Herrera, 2010). En base a esto, el desafío para el desarrollo de los biocombustibles es generarlos sin afectar el medio ambiente y sin poner

en riesgo la seguridad alimentaria y seguridad energética, los biocombustibles deben ser sostenibles y eficientes en términos de costo y energía, y además deben permitir disminuir las emisiones de gases que caracterizan a los combustibles fósiles (WWF, 2009).

Los biocombustibles se dividen en diferentes categorías según su materia prima. Los biocombustibles de primera generación son combustibles generados a partir de productos agrícolas utilizados convencionalmente para el consumo humano o alimentación de animales, por ejemplo la caña de azúcar y el maíz (Environmental Protection Agency. EPA). Estos biocombustibles utilizan como materia prima azúcares, almidones, aceite vegetales o grasas de animales (World Energy Council, 2010). La producción de estos combustibles involucra generación de dióxido de carbono, utilización de energía, deforestación, crecimiento de la erosión del suelo, costos elevados por transporte del material, incremento en el costo de los alimentos, entre otras desventajas (Chappell, y otros). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que los biocombustibles de primera generación contribuyeron con un incremento del 10% en el costo de los alimentos en el 2008 (World Energy Council, 2010). Más allá, se generan gases contaminantes a la atmósfera por la combustión de éstos, por ejemplo en Sao Paulo, Brasil, el principal combustible utilizado es el gasolina con 23% de etanol y como consecuencia en la atmósfera se pueden encontrar concentraciones altas de aldehídos, en particular acetaldehídos y formaldehidos (HCHO) que afectan a la tasa de formación de ozono en una manera significativa (Molina & Molina, 2004). Por otro lado, los biocombustibles de segunda generación o biocombustibles celulósicos utilizan polisacáridos como la celulosa o hemicelulosa para convertirlos en monosacáridos que posteriormente se fermentan para producir alcohol (Environmental Protection Agency. EPA). La celulosa y hemicelulosa se

encuentran entre los biopolímeros más abundantes en la naturaleza (Chappell, y otros), representando una fuente amplia para generación de este tipo de biocombustible. Estos combustibles son generados a partir de cultivos que no son destinados para alimentación o biomasa residual como paja o subproductos de la madera (Environmental Protection Agency. EPA). Sin embargo, en el caso de generar biocombustibles a partir de biomasa residual, el excesivo uso de ésta perjudica las propiedades del suelo y la productividad de los cultivos, debido a que los residuos conservan la calidad del suelo, conservan agua, mejoran la productividad del suelo y capturan carbón en el suelo (Carriquiry, Du, & Timilsina, 2010). Finalmente, los combustibles de interés en este estudio de investigación son los biocombustibles de tercera generación. Estos combustibles utilizan microalgas para obtención de su materia prima (Environmental Protection Agency. EPA) (Tanner, 2009). El biodiesel generado a partir de microalgas posee las mismas características que el combustible convencional según el Consejo de Energía Mundial (World Energy Council) (World Energy Council, 2010).

El proceso para obtención de biocombustibles a partir de biomasa vegetal se realiza a través de procesos físicos como la fermentación o procesos químicos como las transesterificación. Una descripción global del proceso de generación de biocombustibles a partir de la biomasa vegetal se presenta en la Figura 1. Los biocombustibles de origen vegetal se obtienen a partir de las plantas que utilizan  $\text{CO}_2$ , agua, nutrientes y luz solar para realizar fotosíntesis, proceso en el cual las plantas transforman la materia inorgánica en materia orgánica y oxígeno en presencia de luz. Posteriormente, la materia orgánica, es decir, la biomasa es procesada para convertirse en biocombustibles tales como el bioetanol y el biodiesel.



**Figura 1.** Descripción general del proceso mediante el cual se obtienen biocombustibles a partir de biomasa vegetal. Fuente: Posten y Schaub (Posten & Schaub, 2009).

Brasil fue el primer país en utilizar biocombustibles a gran escala, mezclando bioetanol con gasolina (World Energy Council, 2010). Sin embargo, el motivo para implementar esta tecnología no fue reemplazar los combustibles fósiles, sino alcanzar un balance entre la producción y la demanda de azúcar (World Energy Council, 2010). Posteriormente, a finales de los años sesenta e inicios de los años setenta, se impulsó, principalmente en países importadores de crudo, el desarrollo de biocombustibles para reemplazar los combustibles fósiles (World Energy Council, 2010). En el año 2009, las regiones con mayor consumo de biocombustibles fueron Estados Unidos (22,80 millones de toneladas de petróleo equivalente) y Brasil (20,30 millones de toneladas de petróleo equivalente) (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century, 2012).

En Ecuador el Ministerio Coordinador de Producción, Empleo y Competitividad (MCPEC) junto a otros ministerios se encarga de todo lo referente a los biocombustibles en el país y son quienes trabajaron en la elaboración de un marco legal para promover el desarrollo de éstos en el país. Actualmente existen dos grandes proyectos para el desarrollo de biocombustibles en el país: “Proyecto Piloto de Generación de Electricidad Utilizando Aceite Vegetal de Piñón en las Islas Galápagos” y “Proyecto Piloto de Biocombustibles para Guayaquil” (CIE, 2010).

El primer proyecto se encuentra a cargo del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable (MEER) en cooperación con la Cooperación Técnica Alemana (GIZ) y el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). El proyecto tiene como objetivo sustituir el diésel de petróleo por aceite vegetal de piñón para la generación de electricidad en las islas Galápagos, empezando el proyecto en la isla Floreana (Renovable, ND). Este proyecto inició en el 2007 con la planta piloto en la isla Floreana con una inversión inicial de aproximadamente \$2.500.000 (GIZ). En febrero del 2011 se

inauguró la Central de Generación Térmica a partir de aceite vegetal puro de piñón en la isla Floreana, en la cual se cuenta con dos generadores de 69 kW cada uno (GIZ). La generación de electricidad a partir de biocombustibles no solo beneficia a la población en las islas Galápagos, permitiendo reducir el uso de combustibles fósiles, sino también a la provincia de Manabí, ya que en esta provincia se produce el aceite de piñón, lo cual permite contrarrestar la desertificación, sequía y pobreza de Manabí (Energías Renovables para Galápagos. ERGAL).

El segundo proyecto, Proyecto Piloto de Biocombustibles para Guayaquil, consiste en generar gasolina extra con etanol anhidro. El proyecto se basa en producir gasolina extra con un 5% de etanol e incrementar este porcentaje hasta alcanzar un 10%, conforme la disponibilidad de etanol anhidro en el país (Ministerio de Agricultura, Gandería, Acuicultura y, Ministerio del Ambiente, Ministerio de Electricidad y Energía Renovable, & Ministerio de Minas y Petróleo, 2007). Este proyecto es realizado por el Ministerio Coordinador de la Producción, Empleo y Competitividad (MCPEC) junto con las destiladoras Soderaly Producargo, y asociaciones de cañicultores (El Telégrafo, 2012). El objetivo es distribuir la gasolina conocida como Ecopaís en todas las estaciones de Guayaquil para el año 2013 y para el 2016 distribuirla en todo el país (El Telégrafo, 2012) (Ecuavisa, 2012); estadísticas muestran que hasta el año 2011 este combustible podía ser adquirido en aproximadamente 23 gasolineras en Guayaquil (Ministerio de Recursos Naturales No Renovables, 2011). El Ministerio de Recursos Naturales No Renovables asegura que, al comparar los ciclos de vida útil de la gasolina con un porcentaje de etanol y de la gasolina pura, la primera emite menos emisiones de dióxido de carbono a la atmósfera (Ministerio de Recursos Naturales No Renovables, 2011). Con este proyecto 800 cañicultores se han beneficiado y se ha generado un ahorro para todo el país; por ejemplo,

en el periodo de enero a marzo del 2010 se ahorró \$9,6 millones (El Telégrafo, 2012). Sin embargo, en este proyecto se deben considerar las desventajas de la utilización de este biocombustible como sucede en Sao Paulo, Brasil por la generación de aldehídos (Molina & Molina, 2004).

Además, en Ecuador existen proyectos privados para generación de biocombustibles. Uno de estos proyectos es la generación de biodiesel a partir de aceite de cocina usado. Este proyecto se encuentra a cargo de la empresa Intelifuel, empresa conformada por tres socios estadounidenses y uno ecuatoriano y utiliza como materia prima el aceite vegetal usado que se recolecta de aproximadamente 7.500 restaurantes en Quito, luego es purificado en una planta que se encuentra al norte de Quito, para generar biodiesel (Hoy, 2011). Sin embargo, este proyecto no tiene gran acogida en Ecuador según sus productores, debido al precio elevado que tiene el biodiesel frente al diesel de petróleo que en Ecuador es subsidiado. Otro proyecto privado es la producción de biodiesel en la empresa La Fabril. Esta empresa genera 10,2 millones de litros anuales de biodiesel a partir de aceite de palma con el fin de ser combinado con diésel (La Fabril). En este último caso debe considerarse que la desventaja de generación de biocombustibles a partir de palma africana es que debido a los cultivos de ésta se producen compuestos orgánicos volátiles, en particular isoprenos, que a su vez influyen en la formación de ozono troposférico (Parra, 2008).

## **1.1 Biodiesel**

El biodiesel se define de acuerdo a la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (US Standard Specification for Biodiesel, American Society for Testing and Materials (ASTM)), como un combustible compuesto de monoalquil ésteres de ácidos grasos de cadena larga proveniente de aceites vegetales o de grasa animal (Xiong, Li,

Xiang, & Wu, 2007). Los aceites vegetales son extraídos para posteriormente ser transesterificados y obtener el biodiesel. El biodiesel de primera generación corresponde a aquel que es generado a partir de biomasa utilizada generalmente para productos alimenticios como el aceite de palma o aceite de colza (Superintendencia de Industria y Comercio Colombia, 2011), en Europa aproximadamente el 70% del biodiesel es producido a partir de aceite de colza (Havlík, y otros, 2010). El biodiesel de segunda generación, por otro lado, es generado a partir de biomasa que no se utiliza para alimentos como plantas herbáceas o residuos como el aceite de cocina usado (Superintendencia de Industria y Comercio Colombia, 2011). El biodiesel de segunda generación ha sido utilizado recientemente por la aerolínea holandesa KLM como una mezcla de 25% de aceite reciclado con 75% de combustible de jet. Este combustible es utilizado, como proyecto piloto, en la ruta Nueva York – Ámsterdam todos los jueves durante seis meses a partir de marzo del presente año (Haq, 2013).

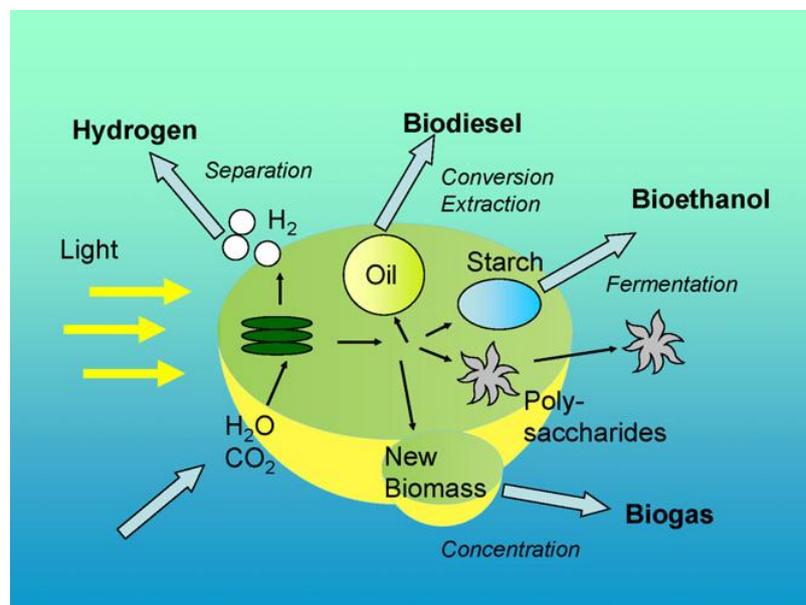
En la Tabla 1 se presentan las propiedades del biodiesel de primera o segunda generación junto a las propiedades de otros combustibles; se puede observar que la densidad energética del biodiesel de primera o segunda generación es  $32,6 \text{ MJ L}^{-1}$ , la cual es similar a la del diésel de petróleo que es  $35,0 \text{ MJ L}^{-1}$ .

Los combustibles de interés en este estudio de investigación son los combustibles de tercera generación, en específico el biodiesel de tercera generación que utiliza microalgas para su producción. En la Figura 2, se ilustra la obtención de biodiesel a partir de las microalgas.

**Tabla 1.** Propiedades de combustibles. Composición química, composición en fórmula, temperatura de ebullición, densidad másica, densidad energética y aplicaciones del biodiesel de primera o segunda generación, etanol, diésel sintético, hidrógeno y diésel de petróleo. Fuente: Posten y Schaub (Posten & Schaub, 2009).

Propiedad	Biodiesel de primera o segunda generación	Etanol <sup>a</sup>	Diésel sintético <sup>a</sup> (Synfuel)	Hidrógeno	Diésel de Petróleo <sup>b</sup> (Referencia)
Composición química	Éster de ácido graso	Alcohol (éter)	Hidrocarburo	H <sub>2</sub> molecular	Hidrocarburo
	C <sub>n</sub> H <sub>xn</sub> O <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> <sup>c</sup>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	C <sub>n</sub> H <sub>2n+2</sub>	H <sub>2</sub>	C <sub>n</sub> H <sub>xn</sub>
	n=14-18, x=2	(ETBE)	n=10-20		n=10-20, x=0,5-2
Composición en fórmula CH <sub>x</sub> O <sub>y</sub>	(CH <sub>2,0</sub> O <sub>0,1</sub> )	(CH <sub>3</sub> O <sub>0,5</sub> ) (CH <sub>2,3</sub> O <sub>0,2</sub> )	(CHO <sub>2,1</sub> )	H <sub>2</sub>	(CHO <sub>1,86</sub> )
Temperatura de Ebullición <sup>d</sup> (°C)	300-360	78,5	160-380 <sup>f</sup>	-252,8	180-360 <sup>f</sup>
Densidad másica <sup>g</sup> (g/cm <sup>3</sup> )	0,88	0,79	0,78	0,017 <sup>h</sup>	0,84
Densidad energética <sup>g</sup> (MJ L <sup>-1</sup> )	32,6	21,2	34,3	1,9 <sup>h</sup>	35,0
Aplicaciones	DE	OE	DE	DE/FC	DE

a: FAME, b: Schaub and Vetter (2008), c: También se usa como materia prima el aceite vegetal (éster de glicerina), d: A 1 bar, e: Rapeseed-metil-éster RME, f: Variable, g: A 15 °C, h: A 300 bar. Abreviaciones: DE: Motor de diésel, OE: Motor de Otto, FC: Pila de combustible (Schenk, y otros, 2008).



**Figura 2.** Obtención de biocombustibles a partir de microalgas: biodiesel, bioetanol, biogás. Fuente: Posten y Schaub (Posten & Schaub, 2009).

El biodiesel es un combustible biodegradable, renovable y no tóxico, cuya primera aplicación fue hace aproximadamente 100 años cuando Rudolph Diesel diseñó el motor original a diesel para que pueda ser usado con aceite vegetal. El Dr. Diesel utilizó aceite de maní para alimentar uno de sus motores en la Exposición Universal de París de 1900 (Bozbas, 2005). En este tiempo parecía una buena opción, porque podía remplazar el diesel en las calderas y en los motores de combustión interna sin necesidad de ajustes importantes, solo se reportaba una ligera disminución en el rendimiento; sin embargo, no se aceptó esta alternativa debido a que el costo del combustible de aceite vegetal era mayor que el del combustible a base de petróleo (Bozbas, 2005). No obstante, en los últimos años se ha retomado el interés en este combustible y con esto se ha fomentado la investigación en obtención de diésel a partir de procesos biológicos, primordialmente a partir de microalgas.

Las microalgas son plantas unicelulares que pueden cultivarse autotrófica, heterotrófica y mixotróficamente. Las microalgas crecen autotróficamente utilizando fuentes de carbono inorgánicas como el bicarbonato de sodio y el dióxido de carbono. Devgoswami y colaboradores evaluaron el crecimiento de *Chlorella*, *Haematococcus* y *Secenedesmus sp.* en medios de cultivo con diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio y dióxido de carbono, obteniendo el porcentaje más alto de lípidos de 31% con *Chlorella sp.* bajo condiciones de crecimiento autotróficas con 4758 mg L<sup>-1</sup> de dióxido de carbono en forma de gas (Devgoswami C. , Kalita, Talukdar, Bora, & Sharma, 2011). Por otro lado, el cultivo de microalgas heterotrófico se realiza con una fuente de carbono orgánica, como la glucosa, y en ausencia de luz. Los investigadores Miao y Wu utilizaron 10 g L<sup>-1</sup> de glucosa en el medio de cultivo para el crecimiento de *Chlorella protothecoides* obteniendo un porcentaje de lípidos de 55% (Miao & Wu, 2006). Finalmente, el cultivo

mixotrófico de microalgas se realiza con una fuente de carbono orgánica y en presencia de luz. Este tipo de cultivo fue realizado por los autores Andrade y Costa quienes cultivaron *Spirulina platensis* utilizando melaza como fuente de carbono orgánica (Andrade & Costa). La concentración máxima de biomasa,  $2,94 \text{ g L}^{-1}$ , se observó después del onceavo día de cultivo en el experimento realizado con una concentración de  $0,75 \text{ g L}^{-1}$  de melaza (Andrade & Costa); sin embargo, no se realizaron ensayos para determinar el contenido de lípidos.

Uno de los factores más importantes para el crecimiento de la microalgas es la fuente de carbono, si el crecimiento es autotrófico generalmente se utiliza el dióxido de carbono para su cultivo. La demanda de dióxido de carbono de las microalgas se ha calculado estequiométricamente y este valor es aproximadamente equivalente a  $1,7 \text{ kg CO}_2 \text{ kg}^{-1}$  de biomasa algal seca (Posten & Schaub, 2009); sin embargo, la concentración de  $\text{CO}_2$  en el aire es apenas de 1% y no es suficiente para satisfacer esta demanda, debido a esto las microalgas se cultivan inyectando concentraciones determinadas de dióxido de carbono. Ge y colaboradores analizaron el crecimiento de *Botryococcus braunii* 765, una microalga verde colonial, bajo concentraciones de  $\text{CO}_2$  entre 2 y 20% en un fotobiorreactor (Ge, Liu, & Tian, 2011). Los resultados del estudio indicaron que esta microalga puede crecer sin ninguna inhibición bajo todas las concentraciones de  $\text{CO}_2$  evaluadas, mostrando una relación directa entre el incremento del contenido de lípidos con el incremento en la concentración de  $\text{CO}_2$ . En el estudio se identificó una máxima concentración de biomasa de  $2,31 \text{ g L}^{-1}$  en el veinticincoavo día del cultivo cuando éstas se encontraban alimentadas con un 20% de  $\text{CO}_2$  (Ge, Liu, & Tian, 2011).

En algunos casos se aprovecha el  $\text{CO}_2$  de las emisiones de plantas de combustión o industrias químicas, reduciendo al mismo tiempo esta fuente de contaminación

atmosférica. Por ejemplo, la compañía Cyanotech en Hawái utiliza el dióxido de carbono proveniente de una planta de combustión para el crecimiento de microalgas (Pedroni, Davison, Beckert, Bergman, & Benemann, 2001). El gas de combustión emanado por dos generadores de 180 kW con una concentración de 8% de CO<sub>2</sub> es transportado a la parte inferior de una torre de absorción de CO<sub>2</sub> en la cual éste se absorbe en el medio de cultivo que ingresa por la parte superior de la torre y se recolecta en la parte inferior para ser alimentado a los estanques en los cuales se encuentran creciendo microalgas (Pedroni, Davison, Beckert, Bergman, & Benemann, 2001).

Las microalgas también requieren nitrógeno y fósforo para su crecimiento (Ge, Liu, & Tian, 2011), usualmente el requerimiento de nitrógeno es de 0,1 a 0,14 en fracción másica (Posten & Schaub, 2009). Una potencial fuente de estos nutrientes son las aguas residuales que han sido sometidas previamente a tratamientos primarios y secundarios, Estas aguas residuales tratadas se caracterizan porque la materia orgánica ha sido removida y cuentan con una concentración rica de nutrientes que permitan el desarrollo de las microalgas. El cultivo de las microalgas en aguas residuales tratadas tiene dos objetivos, proveer de nutrientes a las microalgas para su desarrollo y tratar las aguas residuales mediante la reducción de nutrientes en las mismas (tratamiento terciario). En la investigación realizada por Ruiz y colaboradores para evaluar el crecimiento y remoción de nutrientes con algas verdes libres e inmovilizadas, se realizaron cultivos batch y semicontinuos para tratar agua residual municipal. En los experimentos se cultivó microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* en aguas residuales municipales con concentraciones de: 32,5 mg L<sup>-1</sup> N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; 2,0 mg L<sup>-1</sup> N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y 2,5 mg L<sup>-1</sup> P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. En el resultado final se obtuvo una reducción de nitrógeno de 60,1% y de fósforo de 80,3% (Ruiz-Marin, Mendoza-Espinosa, & Stephenson, 2010), con lo cual se demostró la

efectividad del cultivar microalgas en aguas residuales para remoción de nutrientes. Por otro lado, Li y colaboradores investigaron la viabilidad de cultivar microalgas *Chlorella sp.* en aguas residuales municipales altamente concentradas, generadas de un proceso de espesamiento de lodos activados, con el fin de tratar las aguas residuales y producir energía (Li, y otros, 2011). Los resultados de esta investigación demostraron que después de 14 días de cultivo en experimentos batch las microalgas pudieron remover amonio, nitrógeno total, fósforo y la demanda química de oxígeno (DQO) de las aguas residuales en porcentajes de 93,9, 89,1, 80,9 y 90,8%, respectivamente, y se obtuvo una concentración de lípidos de 11,04% (Li, y otros, 2011). Otro estudio en el cual se redujo los nutrientes de las aguas residuales empleando microalgas es el estudio realizado por Valderrama y colaboradores para tratar aguas residuales recalcitrantes provenientes de la producción de etanol y ácido cítrico utilizando *Chlorella vulgaris* y el macrófito *Lemna minúscula* (Valderrama, Del Campo, Rodriguez, de-Bashan, & Bashan , 2002). Estas aguas residuales recalcitrantes provinieron de dos efluentes diferentes: el primero fue agua residual utilizada en todos los procesos de lavado en el molino y el segundo estuvo compuesto por vinaza (subproducto típico de la destilación de melaza), un efluente generado durante la purificación del azúcar y aguas residuales domésticas de la planta (Valderrama, Del Campo, Rodriguez, de-Bashan, & Bashan , 2002). En este estudio se diluyó el agua residual en un 10%, obteniendo concentraciones iniciales de 3-8 mg L<sup>-1</sup> de amonio, 1,5-3,5 mg L<sup>-1</sup> de fósforo y 3.100 mg L<sup>-1</sup> de DQO (Valderrama, Del Campo, Rodriguez, de-Bashan, & Bashan , 2002). El cultivo de microalgas *C. vulgaris* redujo el ion amonio en 71,6%, fósforo en 28% y la DQO en 61% del agua residual (Valderrama, Del Campo, Rodriguez, de-Bashan, & Bashan , 2002).

El biodiesel se obtiene a partir de la acumulación de lípidos en las células de las microalgas para posteriormente ser transesterificados y convertidos en combustible. El contenido de lípidos en las células de las microalgas varía según las cepas y condiciones de crecimiento, siendo estas condiciones factores ambientales como la temperatura, velocidad de agitación, pH, salinidad del medio de cultivo, macro y micronutrientes en el medio de cultivo, entre otras. Estos factores influyen no solo en el contenido de lípidos, sino también en el crecimiento celular de las microalgas (Herediia-Arroyo, Wei, & Hu, 2010). Converti y colaboradores en su investigación sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento y contenido de lípidos de *Nannochloropsis oculata* y *Chlorella vulgaris* para producción de biodiesel, concluyeron que temperaturas superiores a 30°C afectan el crecimiento y contenido de lípidos de las microalgas *C. vulgaris* (Converti, Casazza, Ortiz, Perego, & Del Borgui, 2009). En el estudio se observó que un aumento de 25 a 30°C de la temperatura en la cual estaban creciendo las microalgas produjo una disminución en el porcentaje de lípidos de *C. vulgaris* de 14,71 a 5,90% (Converti, Casazza, Ortiz, Perego, & Del Borgui, 2009).

Los lípidos de las células de las microalgas son extraídos mediante la aplicación de metanol y cloroformo, con lo cual se logra separar los lípidos del resto de la biomasa. A continuación los lípidos son transformados mediante transesterificación a biodiesel (Herediia-Arroyo, Wei, & Hu, 2010). La transesterificación es el proceso en el cual mediante reacciones orgánicas un ésteres transformado en otro mediante un intercambio del grupo alcoxi (Schuchardt, Sercheli, & Vargas, 1997), como se puede observar en la Ecuación 1.



(Schuchardt, Sercheli, & Vargas, 1997).

R: grupo alquilo.

La producción anual de biodiesel en el mundo ha incrementado de 17,8 billones de litros en el 2009 a 18,5 billones de litros en el 2010 y a 21,4 billones de litros en el 2011 (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century, 2012). En cuanto al costo de producción del biodiesel, en Sudamérica éste varió entre \$ 0,97 y 1,34 por litro en el 2011; en Argentina el costo de biodiesel en el 2011 fue de \$1,06 por litro, en Perú de \$1 por litro, en Colombia \$1,34 por litro y en Paraguay \$0,97 por litro (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century).

Las ventajas de la utilización de biodiesel es que durante el proceso de combustión, se emite menos dióxido de carbono a la atmósfera como otros combustibles (Xu, Miao, & Wu, 2006), lo cual permite disminuir el impacto ambiental por la emisión de gases de combustión. En comparación a la generación de biodiesel a partir de plantas, como la palma, la ventaja de la utilización de microalgas es que éstas tienen una mayor eficiencia fotosintética que las plantas terrestres (Chappell, y otros). Las microalgas tienen la capacidad de convertir más del 5% de la energía de luz solar en biomasa, mientras que las plantas terrestres tienen una eficiencia energética en climas templados menor al 1% (Posten & Schaub, 2009). Las microalgas utilizan gran parte de su energía para acumular biomasa de manera más rápida (6 a 12 horas de ciclo de crecimiento) (Chappell, y otros). Otra ventaja de la generación de biodiesel a partir de microalgas es que éstas tienen la capacidad de reciclar y capturar el CO<sub>2</sub> e inclusive pueden utilizar los nutrientes presentes en aguas residuales tratadas como se discutió previamente (Chappell, y otros). Más allá, la producción de biodiesel a partir de microalgas no necesita grandes áreas por cantidad de biodiesel producido, el área necesaria para el cultivo de las microalgas es mucho menor que la necesaria para generar este combustible a partir de aceites de plantas (Tanner, 2009).

En la Tabla 2 se presenta una comparación del área requerida para producción de biodiesel a partir de diferentes aceites de plantas. La producción de biodiesel a partir de algodón, soya y semillas de mostaza requiere de grandes áreas de terreno, por ejemplo en el caso de la generación de biodiesel a partir de algodón se necesitaría sembrar aproximadamente el 100% de la masa global del planeta para satisfacer la demanda mundial de este combustible. Mientras que si se generara biodiesel a partir de aceite de palma se requeriría sembrar 5,5% de la masa global del planeta, y la generación a partir de microalgas necesitaría apenas un 0,3% de la masa global del planeta, siendo el área requerida por las microalgas aproximadamente 18 veces menor que la requerida para el cultivo de palma para la producción de biodiesel. Además, en comparación a los biocombustibles que se producen a partir de maíz o soya, la generación de biodiesel a partir de microalgas no pone en riesgo la seguridad alimentaria de la humanidad ni deteriora el suelo por monocultivos. Estudios han demostrado que la generación de biodiesel a partir de productos alimenticios; no solo requiere invertir energía, agua y fertilizantes para su producción, sino que también genera un incremento en los precios de los productos, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria mundial. Además, los biocombustibles generados a partir de plantas promueven el desarrollo de monocultivos que deterioran la calidad del suelo por pérdida de nutrientes y se genera erosión.

**Tabla 2.** Comparación del área requerida para producción de biodiesel a partir de diversos aceites de plantas. Fuente: Tanner (Tanner, 2009).

<b>Fuente Vegetal</b>	<b>Biodiesel (Lha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>)</b>	<b>Área necesaria para producir la demanda global de combustibles (ha * 10<sup>6</sup>)</b>	<b>Área requerida como porcentaje de la masa global del planeta</b>	<b>Área como porcentaje de la tierra que se utiliza para sembríos en el planeta</b>
<b>Algodón</b>	325	15.002	100,7	756,9
<b>Soya</b>	446	10.932	73,4	551,6
<b>Semillas de mostaza</b>	572	8.524	57,2	430,1
<b>Girasol</b>	952	5.121	34,4	258,4
<b>Colza / canola</b>	1.190	4.097	27,5	206,7
<b>Jatropha</b>	1.892	2.577	17,3	130 (0 <sup>a</sup> )
<b>Aceite de palma</b>	5.950	819	5,5	41,3
<b>Algas (10 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> a 30% TAG)</b>	12.000	406	2,7	20,5 (0 <sup>a</sup> )
<b>Algas (50 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> a 50% TAG)</b>	98.500	49	0,3	2,5 (0 <sup>a</sup> )

<sup>a</sup>: Si los estanques y birreactores se sitúan en tierra que no sirve para sembríos.

TAG: Triacilglicéridos (Tanner, 2009).

La principal desventaja de la producción de biodiesel a partir de aceite de microalgas es su elevado costo de producción en comparación con el costo de producción de los combustibles convencionales, lo que hace que el biodiesel a partir de microalgas no pueda competir en el mercado actual. Por ejemplo, en Argentina en el 2011 el precio del diésel de petróleo fue \$0,78 por litro (La Nación, 2011), mientras que el del biodiesel fue \$1,06 por litro (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century); es decir, el biodiesel fue un 35,9% más caro. El costo elevado del biodiesel se debe principalmente a dos razones, la inversión necesaria para adquirir la fuente de carbono para cultivar las microalgas y la inversión en la tecnología para extracción de los lípidos de las microalgas. Los estudios científicos alrededor del mundo se han enfocado en reducir este costo, investigando el cultivo de microalgas en medios más baratos y de fácil acceso (Cheng, Lu, Gao, & Wu, 2009), así como también estudiando las condiciones favorables para maximizar el contenido de lípidos en las células de las microalgas.

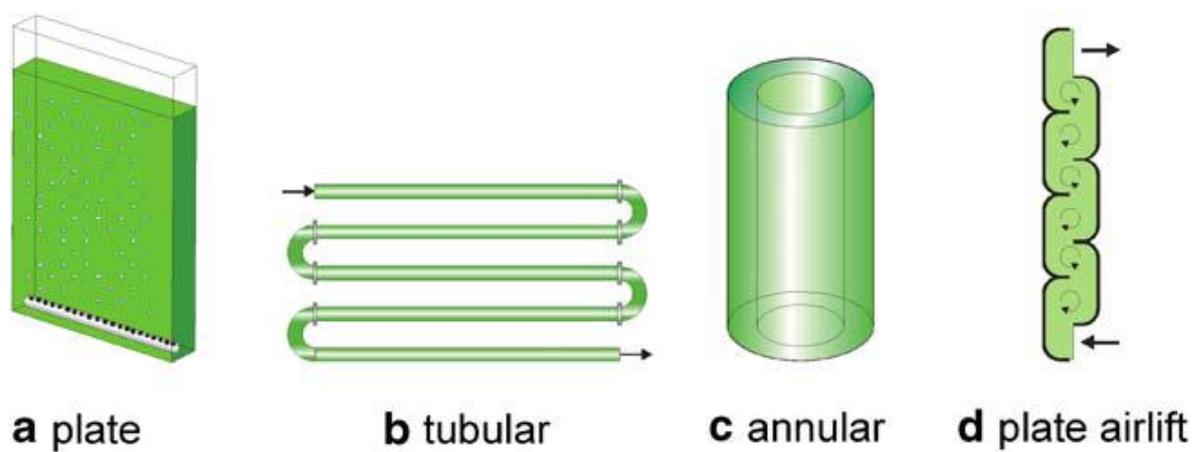
En este proyecto de investigación se utilizaron microalgas de la especie *Chlorella* en cultivos autotróficos con el objetivo de estudiar las condiciones de cultivo adecuadas para maximizar el contenido de lípidos en las microalgas en bioensayos en modo de operación batch y semicontinuo. La especie *Chlorella* son microalgas verdes muy importantes comercialmente, debido a que representan tanto una fuente de alimento como de energía gracias a su alta eficiencia fotosintética. Las microalgas *Chlorellas* tienen un contenido de proteínas de 51 a 58%, de carbohidratos de 12 a 17% y de lípidos de 14 a 22% (Yeh, Chang, & Chen, 2010). El porcentaje de lípidos en las microalgas se puede maximizar cultivándolas en las condiciones adecuadas. En este proyecto de investigación se utilizó como fuente de carbono el bicarbonato de sodio ya que tiene la ventaja de ser

más soluble que el  $\text{CO}_2$  lo que facilita su retención en el medio (Devgoswami C. , Kalita, Talukdar, Bora, & Sharma, 2011).

## 1.2 Estanques y Fotobiorreactores

El cultivo de microalgas se puede realizar tanto en estanques como en fotobiorreactores. En Alemania se empezó a cultivar algas con fines alimenticios en estanques abiertos durante la segunda guerra mundial (Tredici, 2004). Después éstas fueron cultivadas para reducir el  $\text{CO}_2$  en la atmósfera proveniente de la contaminación industrial, así como también para el tratamiento de aguas residuales ricas en nutrientes en Estados Unidos. Los estanques generalmente contienen agua en una profundidad entre 15 y 20 cm, y se alcanzan concentraciones de biomasa de  $1 \text{ g L}^{-1}$  en peso seco y una producción entre 60 y  $100 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$  de biomasa algal seca (Tredici, 2004). La ventaja de utilizar estanques es que pueden ser construidos y operados sin mayores gastos en infraestructura y tecnología, mientras que la principal desventaja es que el cultivo de microalgas se realiza en sistemas abiertos en contacto con la atmósfera donde se puede perder agua por evaporación, no se puede controlar la temperatura para optimizar el crecimiento de las microalgas y adicionalmente especies no deseadas pueden introducirse a largo plazo (Schenk, y otros, 2008). Frente a estopara mejorar la eficiencia de cultivo de microalgas se desarrollaron los fotobiorreactores (Ugwu, Aoyagi, & Uchiyama, 2008). Los fotobiorreactores consisten en reactores de platos, tubulares, anulares y de platos con flujo de aire, en los cuales se cultivan las microalgas bajo condiciones controladas de temperatura, luz, agitación, entre otras. En la Figura 3 se presentan los diferentes sistemas de fotobiorreactores empleados en la actualidad. En la Figura 4 se presenta un ejemplo de un fotobiorreactor construido a nivel industrial, es el fotobiorreactor cerrado más largo del mundo en Klötze, Alemania que produce hasta 100 toneladas de microalgas por

año(Schenk, y otros, 2008). Aunque el costo de los fotobiorreactores puede ser elevado, las ventajas que presenta este sistema con respecto a la utilización de estanques incluyen ahorro de agua, de energía, de reactivos; elevada productividad consecuentemente una huella ecológica menor con respecto a la utilización de espacio (Schenk, y otros, 2008).



**Figura 3.** Sistemas de fotobiorreactores: platos, tubular, anular y platos con flujo de aire.  
Fuente: Schenk y colaboradores (Schenk, y otros, 2008).



**Figura 4.** Sistema de biorreactor cerrado. El fotobiorreactor cerrado más largo del mundo en Klötze, Alemania, 700 m<sup>3</sup> están distribuidos en 500 km de tubos y producen hasta 100 toneladas de microalgas por año. Fuente: Schenk y colaboradores (Schenk, y otros, 2008).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Mundialmente los combustibles fósiles representa aproximadamente el 80% de la fuente de energía primaria de la matriz energética; sin embargo, la disminución de las reservas de estos recursos, en especial del petróleo, la complejidad de los procesos de extracción y procesamiento, y su elevado costo de producción han afectado la seguridad energética a nivel mundial (Mata, Martins, & Caetano, 2010). Adicionalmente, el incremento en la generación de gases provenientes de la quema de combustibles fósiles, como el dióxido de carbono, ha despertado un gran interés en la comunidad internacional en el desarrollo y utilización de fuentes de energía renovables como los biocombustibles.

Los biocombustibles representan una gran alternativa para suplir la demanda energética global, principalmente en lo que se refiere al sector del transporte. Además, permiten mitigar los impactos ambientales generados por las emisiones de la quema de combustibles fósiles y mitigar los impactos en la economía por las fluctuaciones del precio del petróleo (World Energy Council, 2010). Los biocombustibles tienen la ventaja de ser generados a partir de fuentes renovables y que durante su combustión emiten menos gases tóxicos al ambiente, de hecho el Fondo Mundial para la Naturaleza, World Wildlife Fund (WWF), menciona que la utilización de biocombustibles bajo prácticas sostenibles podría reducir en un 60 a 80% las emisiones de gases contaminantes a nivel mundial (WWF, 2009). En cuanto a los beneficios sociales, la producción de biocombustibles genera puestos de trabajo contribuyendo a mejorar la economía de las poblaciones. Por ejemplo, en Manabí se está produciendo piñón para generar biocombustibles para Galápagos lo cual permite generar fuentes de trabajo en esta provincia que registra un elevado índice de pobreza a nivel nacional. Adicionalmente, durante la producción de biocombustibles se pueden aprovechar áreas de terreno que no son adecuadas para cultivos, por falta de

nutrientes o humedad como en el caso de Manabí. Sin embargo, los beneficios económicos de los biocombustibles aún no son palpables debido al alto costo de producción; por lo tanto el desarrollo de tecnologías económicamente viables para la generación de biocombustibles con una relación costo-beneficio apropiada es de gran importancia a nivel mundial.

Una de las desventajas de la utilización de biocombustibles de primera generación es que podrían poner en riesgo la seguridad alimentaria de la población y pueden causar una pérdida de biodiversidad por monocultivos (WWF, 2009); sin embargo, los biocombustibles de tercera generación, como es el caso del biodiesel producido a partir de microalgas, por el contrario utilizan eficientemente el área de terreno para su producción y no ponen en riesgo la seguridad alimentaria; más aún, una vez que los lípidos son extraídos de las microalgas, la biomasa puede ser utilizada para producir etanol, metano, alimento de ganado o fertilizante orgánico, entre otros (Mata, Martins, & Caetano, 2010). Desde el punto de vista ético, los biocombustibles generados a partir de microalgas, cuando son producidos en conformación con las políticas adecuadas, cumplen con los requisitos para generación de biocombustibles: 1. Los biocombustibles no deben desarrollarse a expensas de los derechos esenciales de las personas, 2. Deben ser sostenibles, 3. Deben contribuir a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, 4. Deben reconocer el derecho de las personas a una justa paga y 5. Los costos beneficios de los biocombustibles deben ser distribuidos de una manera equitativa (Buyx & Tait, 2012).

La desventaja de la generación de biodiesel a partir de microalgas es el costo de su producción. En la actualidad las investigaciones se enfocan en mejorar la eficiencia de la producción de biodiesel a partir de microalgas, disminuyendo el precio de este combustible y convirtiéndolo en un combustible comercialmente atractivo.

En Ecuador con el objeto de diversificar las fuentes de energía, la generación, comercialización y uso de biocombustibles han sido consideradas como “interés nacional”, según el Decreto Ejecutivo No. 2332 emitido en el 2004 (CIE, 2010). El desarrollo de los biocombustibles en el país está iniciando con proyectos como el de la generación de electricidad en Galápagos a partir de piñón y el combustible Ecopaís en Guayaquil. Sin embargo, la generación de biodiesel a partir de microalgas no ha sido muy investigada en el país. En este contexto, el objetivo de este proyecto de investigación es determinar las condiciones adecuadas de cultivo autotrófico de microalgas para la optimización de la concentración de biomasa y contenido de lípidos. La concentración de bicarbonato de sodio, las condiciones adecuadas de iluminación, tiempo de cultivo, la agitación, la frecuencia de extracción de lípidos, entre otros, fueron las principales condiciones de operación evaluadas para maximizar el contenido de lípidos y de este modo su potencial de producción de biodiesel. La generación de biodiesel a partir de microalgas en el país permitirá generar empleos y ampliar la matriz energética. También permite en general disminuir las emisiones atmosféricas típicas de la combustión de combustibles fósiles; sin embargo, se debe realizar un análisis sobre las emisiones de los biocombustibles producidos a partir de microalgas con el fin de determinar los beneficios o efectos adversos de éstos en la calidad del aire.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 General**

El objetivo general de este proyecto de investigación fue determinar las condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento autotrófico de microalgas *Chlorella*, con el fin de maximizar el porcentaje de lípidos para la potencial producción de biodiesel. Las microalgas fueron fortalecidas y cultivadas aplicando diferentes medios de cultivo. La concentración adecuada de bicarbonato de sodio como fuente de carbono inorgánico en el medio de cultivo para el crecimiento de las microalgas, el tiempo de cosecha propicio, la efectividad de agitación de los cultivos de microalgas y la frecuencia de extracción de lípidos fueron evaluados en bioensayos batch y semicontinuos, con el fin de optimizar el proceso de producción de lípidos para la generación de biodiesel.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Fortalecer y cultivar microalgas *Chlorella*, identificando el medio de cultivo óptimo para el desarrollo de las mismas y determinando el tiempo adecuado en el cual se debe realizar el cambio a medio de cultivo fresco.
- Identificar la concentración adecuada de bicarbonato de sodio en el medio de cultivo, el tiempo de cosecha propicio y la efectividad de la agitación para maximizar la concentración de biomasa y contenido de lípidos de las microalgas en bioensayos batch.
- Diseñar, implementar y monitorear ensayos para cultivo e incremento de la concentración de microalgas bajo condiciones de operación semicontinuas en términos de la concentración de bicarbonato de sodio y la frecuencia de extracción de lípidos.

- Diseñar el proceso de instalación y operación de un fotobiorreactor para cultivo de microalgas y producción de lípidos en condiciones de operación semicontinuas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Reactivos

Nitrato de sodio (99,3%, pureza), cloruro de calcio dihidratado (74%), sulfato de magnesio (98%), fosfato de potasio dibásico (98%), fosfato de potasio monobásico (99%), cloruro de sodio (99,6%), cloruro de amonio (90%), bicarbonato de sodio (99,7-103%) fueron adquiridos en Laboratorios H.V.O (Quito, Ecuador). Proteosa peptona (83%) fue proporcionada por DIPCO (Quito, Ecuador). Metanol (99,5%) y cloroformo (99,9%) se obtuvieron en Laboratorios H.V.O (Quito, Ecuador). El fertilizante NUTRI-LEAF 20-20-20 (Miller Chemical & Fertilizer Corp., Hannover U.S.A.) se adquirió en Kywi Supercentro Ferretero (Quito, Ecuador).

### 4.2 Microalgas

Las microalgas que se utilizaron en este estudio corresponden a dos diferentes cepas madre. La cepa denominada como Nativa fue adquirida de una cepa madre de *Chlorella sp.* perteneciente a la Escuela Politécnica Nacional. Por otro lado, las cepas EEUU, USA1, USA1+F y USA2 son *Chlorellas Protothecoides UTEX 250* y fueron importadas de Estados Unidos; éstas microalgas provienen de un cultivo madre de la Universidad de Texas en Austin (Texas, U.S.A), son de origen holandés y son conocidas también como *Chlorella vulgaris* (UTEX). La cepa EEUU fue importada en septiembre del 2011, mientras que las cepas USA1, USA2 y USA1+F fueron importadas en diciembre del 2011 de la Universidad de Texas en Austin, U.S.A.

### 4.3 Medio de Cultivo

En este proyecto de investigación se emplearon dos medios de cultivo, uno para el crecimiento propiamente de las microalgas, recomendado por la Universidad de Texas en Austin para el cultivo *Chlorella vulgaris* conocido como medio de proteosa, y otro para recuperar las cepas de microalgas que no se encontraban saludables denominado en este proyecto de investigación como medio con fertilizante. El medio con fertilizante se elaboró utilizando como base el medio de cultivo Sueoka's con contenido alto de sales y se añadió una concentración determinada de fertilizante NUTRI-LEAF-20-20-20.

#### 4.3.1 Medio de Proteosa

El medio de proteosa es un medio de agua fresca para cultivos axénicos (UTEX, Proteose Medium). El medio de proteosa se preparó agregando  $1 \text{ g L}^{-1}$  de proteosa peptona al medio Bristol. La composición del medio Bristol fue en ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$  (0,25),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,025),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,075),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,075),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,175) y  $\text{NaCl}$  (0,025) (UTEX, Bristol Medium). El pH del medio de cultivo se mantuvo entre 6 y 7. El medio preparado fue dividido en dos botellas de vidrio de 1L y fueron autoclavadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito empleando un autoclave Sterilmatic (Market Forge Industries INC., Massachusetts, U.S.A).

#### 4.3.2 Medio con Fertilizante

El medio con fertilizante estuvo compuesto de cuatro soluciones: solución de sales también conocida como solución de Beijerinck's (Sueoka's high salt medium) y solución de fosfato, cada una en una concentración de  $5 \text{ mL L}^{-1}$ ; solución de elementos traza y solución de bicarbonato de sodio, cada una en una concentración de  $1 \text{ mL L}^{-1}$  y al final se agregó  $1 \text{ g L}^{-1}$  de fertilizante NUTRI-LEAF 20-20-20. La composición de la solución de

sales fue en ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (4) y  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2). La composición de la solución de fosfato fue en ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (288) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (144) (Sueoka's high salt medium). La solución de bicarbonato de sodio estuvo compuesta por  $\text{NaHCO}_3$  en una concentración de 8%. La solución de elementos traza fue en ( $\text{mg L}^{-1}$ ):  $\text{H}_3\text{BO}_3$ (50),  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2.000),  $\text{ZnCl}_2$  (50),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (50),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (50),  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (90),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2.000),  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (50),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (30),  $\text{NaSeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (100), EDTA (1.000), resazurin (200) y  $1 \text{ mL L}^{-1}$  HCl 36%. El fertilizante utilizado fue NUTRI-LEAF 20-20-20 (Miller Chemical & Fertilizer Corp., Hanover, U.S.A) con una composición en (%):  $\text{NO}_3$  (6,20),  $\text{NH}_4^+$  (6,20), N orgánico (7,60), N total (20), P asimilable (20), K soluble en agua destilada (20), B (0,02), Cu (0,05), Fe (0,10), Mn (0,05), Zn(0,05) y Mo (0,0005).

#### **4.4 Crecimiento de Microalgas**

El crecimiento de las microalgas en este estudio fue realizado en experimentos bajo condiciones de operación batch y semicontinuas. Las cepas de microalgas que se utilizaron en este proyecto de investigación fueron cultivadas en erlenmeyers de 500 o 1.000 mL cubiertos con tapas de esponja silicón que permitieron el ingreso de aire atmosférico para el crecimiento de las microalgas, pero al mismo tiempo previnieron la contaminación de las microalgas con agentes exteriores. Las microalgas fueron cultivadas en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito (LIA-USFQ) en un compartimiento independiente y aislado, permanecieron a  $25^\circ\text{C}$  y bajo luz fluorescente blanca fría mediante tres lámparas OSRAM de 20 W en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad controlado a través de un temporizador Heavy Duty Timer (Intermatic, Illinois, U.S.A). Las microalgas fueron sometidas a agitación para reducir problemas de transferencia de masa. La agitación fue suministrada manualmente una vez al día, con un

agitador magnético (Agitador Magnético HI301N, Hanna Instruments Inc., U.S.A) a una velocidad de 280 rpm o con un agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) a una velocidad de 225 rpm.

Los bioensayos batch y semicontinuos de cultivo de microalgas se realizaron con cepas puras empleando medios de cultivo con diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio. Los experimentos batch fueron realizados con un volumen fijo de medio, mientras que en los ensayos bajo condiciones de operación semicontinuas se agregó periódicamente medio fresco hasta alcanzar un volumen determinado. Para la evaluación del crecimiento de las microalgas bajo diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio en los experimentos batch se utilizaron controles en los cuales se empleó la misma concentración de microalgas y volumen de medio de cultivo pero sin bicarbonato de sodio. El crecimiento de las microalgas en todos los bioensayos se evaluó a través de la medición de la absorbancia del medio de cultivo, lo cual representa una medida indirecta del crecimiento de la población algal. El crecimiento de la población algal también fue evaluado en términos de la concentración de biomasa y el porcentaje de lípidos extraídos de las células de las microalgas.

En relación a la población algal, la absorbancia se determinó utilizando un espectrofotómetro (Spectronic 20 D+, New York, U.S.A) y las longitudes de onda empleadas fueron 600, 680 nm y 750 nm. El monitoreo de la absorbancia se realizó una vez al día usualmente a la misma hora del día con un máximo dos horas de diferencia entre mediciones y se construyeron curvas de crecimiento de población algal en función de las mediciones de absorbancia con respecto al tiempo. El espectrofotómetro (Spectronic 20 D+, New York, U.S.A) fue encerado previo uso en todas las ocasiones con el medio de cultivo utilizado en el experimento sin microalgas. Para las mediciones se tomaron mínimo

4 mL de muestra con una pipeta automática Biopette A (Labnet Intenational Inc., Woodbridge, U.S.A) de 1 mL. Cuando la absorbancia registrada fue mayor a 3 se realizaron diluciones. Cabe recalcar que la determinación de la absorbancia también se utilizó para el control del crecimiento de las cepas puras.

La concentración de biomasa algal fue obtenida a partir del peso de las microalgas secas en los diferentes bioensayos y fue expresada en  $\text{g L}^{-1}$ . El porcentaje de lípidos fue determinado a través de la extracción del aceite contenido en las células de las microalgas con solventes orgánicos. Los protocolos empleados para determinar la concentración de biomasa algal y contenido de lípidos se encuentran descrito en la sección de Métodos Analíticos.

#### **4.5 Transferencia de Microalgas a Medio de Cultivo Fresco**

Las microalgas fueron colocadas en un medio de cultivo fresco periódicamente cuando se identificó que el medio de cultivo en el que se encontraban ya no les permitía crecer por falta de nutrientes (González, 2000). El momento en el cual se debían cambiar las microalgas a un medio fresco fue establecido a través de la curva de crecimiento de población algal. Las microalgas fueron cosechadas cuando la curva de crecimiento de población algal se encontró en la fase estacionaria o iniciando la fase de declinación tanto para la transferencia de las microalgas a un medio de cultivo fresco, en el caso de cepas puras, como para la finalización de un experimento, en el caso de los bioensayos de crecimiento autotrófico. Generalmente el cambio a un medio fresco se realizó una vez por semana para las cepas puras. La transferencia de las microalgas a un medio de cultivo fresco se efectuó permitiendo que las microalgas sedimenten en el fondo del erlenmeyer por gravedad como se puede observar en la Figura 5. Posteriormente, las microalgas fueron extraídas con una pipeta automática Biopette A (Labnet Intenational Inc., Woodbridge,

U.S.A) de 1 mL y fueron transferidas a un medio de cultivo fresco para continuar con su crecimiento. Todos los materiales e instrumentos utilizados en este proceso fueron autoclavados previamente para prevenir contaminación de las cepas.



**Figura 5.** Fotografía de cambio a medio fresco (medio de proteosa) de cepa USA2. Microalgas sedimentadas en el fondo del erlenmeyer (color verde oscuro) (Fotografía por Ana Gabriela Dávila).

## 4.6 Cultivo Autotrófico de Microalgas

El cultivo autotrófico de microalgas para maximizar la obtención de lípidos se llevó a cabo en presencia de diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio en bioensayos bajo condiciones de operación batch y semicontinuas. Todos los ensayos fueron cultivados en un sitio cerrado con lámparas OSRAM de luz fluorescente blanca fría de 20 W en un periodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad controlado a través de un temporizador Heavy Duty Tomer (Intermatic, Illinois, U.S.A) y temperatura de 25°C. La absorbancia se monitoreó diariamente empleando un espectrofotómetro (Spectronic 20 D+, New York, U.S.A) en longitudes de onda de 600, 680 y 750 nm. Como describió en la sección 5.4 de Crecimiento de Microalgas, en base a las curvas de crecimiento de población algal se identificó cuando los experimentos alcanzaron la fase estacionaria o iniciaron la fase de declinación y se procedió a extraer las microalgas del bioensayo, se midió la concentración de la biomasa y se realizó la extracción de lípidos.

## 4.7 Bioensayos en Modo de Operación Batch

El cultivo de las microalgas para la extracción de lípidos se realizó en bioensayos bajo condiciones de operación batch empleando las cepas de cultivos de microalgas USA1, USA2 y USA 1+F en el medio de proteosa con diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio. Volúmenes de cepas de microalgas puras equivalentes a 50 y 100 mL, dependiendo de la cantidad de algas puras saludables disponibles, fueron colocados en 200 mL de medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio en el rango de 0,05 a 43,39 gL<sup>-1</sup>.

El efecto de tres parámetros de operación para maximizar la producción de lípidos se estudió bajo condiciones batch: el tiempo de cosecha de las microalgas, la concentración

de bicarbonato de sodio en el medio de cultivo y el efecto de la agitación. En cuanto al tiempo de cosecha se evaluaron periodos de 4-6, 14 y 26 días de operación. En el caso de la concentración de bicarbonato de sodio se analizaron rangos medianos de concentración de 8 y 43,39 g L<sup>-1</sup> y rangos bajos de concentración de 0,05; 0,075; 0,1; 0,5; 1; 5; 8 y 10 g L<sup>-1</sup>. En términos del efecto de la agitación se evaluaron tres técnicas que incluyeron agitación manual realizada una vez al día, agitación empleando un agitador con barra magnética (Agitador Magnético HI301N, Hanna Instruments Inc., U.S.A) durante todo el bioensayo a una velocidad de 280 rpm y agitación a través de un agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) a una velocidad de 225 rpm con regulador de temperatura a 25°C. En el caso de los bioensayos batch realizados con el agitador con barra magnética (Agitador Magnético HI301N, Hanna Instruments Inc., U.S.A) y con el agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A), las concentraciones de bicarbonato de sodio evaluadas en los bioensayos fueron de 0,1; 1 y 10 g L<sup>-1</sup>.

#### **4.8 Bioensayos en Modo de operación semicontinuo**

El cultivo autotrófico de microalgas para maximizar la obtención de lípidos en los bioensayos en modo de operación semicontinuo se realizó empleando 50 o 100 mL de microalgas de las cepas puras y 200 mL de medio de proteosa con diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio. Las concentraciones de bicarbonato de sodio evaluadas en estos bioensayos fueron 0,1 y 1 g L<sup>-1</sup>. Los bioensayos fueron sometidos a agitación constante a una velocidad de 225 rpm en un agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) con ajuste de temperatura a 25°C. Tres experimentos se realizaron bajo este modo de operación. El primer experimento en condiciones de operación semicontinuas(SM1) estuvo compuesto de 200 mL de medio de proteosa con 0,1 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio y 100 mL de la cepa USA 2. Este bioensayo fue alimentado

periódicamente con 400 mL de medio de proteosa con  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio. El tiempo de alimentación del medio de cultivo estuvo determinado por la curva de crecimiento de población algal, es decir, se agregó el medio de cultivo fresco en base a la fase estacionaria o al inicio de la fase de decaimiento. En este bioensayo SM1 se realizaron tres extracciones de lípidos de la siguiente forma. Las dos primeras extracciones se realizaron cuando la curva de crecimiento de población algal inició la fase de decaimiento, empleando una fracción del bioensayo, previo a la alimentación del medio de cultivo fresco y tomando un volumen mínimo de 200 mL. Las microalgas fueron separadas mediante sedimentación, éstas fueron sometidas a un proceso de secado y se determinó la concentración de biomasa seca y finalmente se realizó la extracción de lípidos de acuerdo a los protocolos descritos en la sección de Métodos Analíticos. La tercera extracción de lípidos del experimento SM1 se realizó cuando el bioensayo alcanzó un volumen de 1 L, procediendo con la separación de las microalgas, el cálculo de la concentración de biomasa y la extracción de lípidos. El segundo (SM2) y tercer (SM3) bioensayos bajo condiciones de operación semicontinuas estuvieron compuestos de 50 mL de la cepa de microalgas USA2 en 200 mL iniciales de medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de  $0,1$  y  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Periódicamente, los bioensayos fueron alimentados con 400 mL de medio fresco hasta alcanzar un volumen de 1 L. En los bioensayos SM2 y SM3 se realizó una única extracción de lípidos al finalizar los experimentos siguiendo los protocolos descritos en la sección de Métodos Analíticos.

## **4.9 Diseño del Proceso de Instalación y Operación de un Fotobiorreactor Tubular**

El diseño del proceso de instalación y operación de un fotobiorreactor tubular con flujo de aire fue realizado en este proyecto de investigación con el fin de maximizar la concentración de biomasa y contenido de lípidos de las microalgas. El fotobiorreactor fue diseñado por el Dr.-Ing. Ródney Peñafiel y financiado por el programa de Maestría en Desarrollo Sustentable de la Universidad de Calgary en cooperación con la Universidad San Francisco de Quito. Los criterios de operación que se tomaron en cuenta para el funcionamiento del fotobiorreactor fueron determinados en base a la literatura: suministro de fuente de carbono, provisión de luz, mezclado, control de temperatura, control del crecimiento celular, control de la concentración de biomasa y contenido de lípidos, y eliminación del oxígeno en forma de gas dentro del fotobiorreactor.

### **4.10 Métodos Analíticos**

#### **4.10.1 Medición de la Concentración de Biomasa de Microalgas.**

La concentración de biomasa generada por las microalgas se determinó mediante la separación de las microalgas del medio de cultivo en el cual se encontraban y el secado de las mismas aplicando el método recomendado en el estudio para desarrollo del crecimiento sostenible de microalgas para biocombustibles en Ecuador realizado por Sarah Dischinger (Dischinger , 2012). El volumen total de cada experimento se transfirió a tubos falcon de 50 mL. Este volumen fue centrifugado en una centrífuga Centra MP4 (International Equipment Company, Massachusetts, U.S.A) del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad San Francisco de Quito durante 10 minutos a 5.000 rpm, el resultado fue la sedimentación de las microalgas en el fondo de los tubos. A continuación se retiró el medio

de cultivo con una pipeta automática Biopette A (Labnet International Inc., Woodbridge, U.S.A) de 5 mL. Posteriormente, se secaron las microalgas colocando los tubos falcon de 50 mL con las microalgas a 105°C en un horno GC-Series Lab Ovens (Quincy Lab. Inc., Chicago, U.S.A) durante 8 horas. La concentración másica final de células, también conocida como concentración de biomasa, expresada en g L<sup>-1</sup> se determinó en función del peso total de la biomasa y del volumen final del experimento utilizando la siguiente ecuación:

$$B = \frac{TFBS_{50} - TFV_{50}}{V} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde:

B = concentración de biomasa (g L<sup>-1</sup>)

TFBS<sub>50</sub> = peso de tubos falcon de 50 mL con biomasa seca (g)

TFV<sub>50</sub> = peso de tubos falcon de 50 mL vacíos (g)

V = volumen final del experimento (L).

#### **4.10.2 Extracción de Lípidos.**

La extracción de lípidos a partir de la biomasa seca se realizó empleando el método presentado en el estudio de Folch y colaboradores sobre la identificación de un método simple para el aislamiento y purificación de los lípidos totales en tejidos animales (Folch, Less, & Stanley, 1956). La biomasa seca fue molida en un mortero de cerámica de 15 cm de diámetro rompiendo las paredes celulares hasta que obtener un polvo fino. La biomasa molida de cada experimento se colocó en tubos falcon de 15 mL, independientemente ya continuación se pesaron estos tubos y se añadieron 2 mL de cloroformo y 1 mL de metanol a cada tubo. El contenido de los tubos fue mezclado con un vórtex Vortexer 59A (Denville Scientific Inc., Edison, U.S.A) para permitir el contacto de los solventes orgánicos con las

microalgas por aproximadamente un minuto. Posteriormente, los tubos fueron colocados en una centrífuga K Centrifuge para tubos falcon de 15 mL (Gemmy Industrial Corp., Taiwán, China) del Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito durante 10 minutos a 3.000 rpm para separar la biomasa del sobrenadante. El sobrenadante libre de biomasa fue transferido a otro tubo falcon de 15 mL y se añadieron 5 mL de agua destilada a este tubo. El contenido de estos tubos fue mezclado con un vórtex Vortexer 59A (Denville Scientific Inc., Edison, U.S.A) por un minuto y a continuación fueron centrifugados empleando la centrífuga K Centrifuge (Gemmy Industrial Corp., Taiwán, China) durante 10 minutos a 3.000 rpm. Después de este procedimiento, se obtuvo tres fases en los tubos falcon de 15 mL, que desde arriba hacia abajo, fueron: agua (transparente), metanol/masa de células (blanco) y cloroformo/lípidos (verde o amarillo), separadas en función de las densidades de cada fase. Este proceso se realizó de 2 a 4 veces por bioensayo con el fin de extraer la mayor cantidad de lípidos producidos por las microalgas. La fase compuesta de cloroformo y lípidos fue separada manualmente empleando una pipeta automática Biopette A (Labnet International Inc., Woodbridge, U.S.A) de 1 mL y fue transferida a tubos de cultivo de cristal de 10 mL. Esta fase fue sometida a un proceso de evaporación bajo una corriente de aire en una sorbona durante cuatro días. El cloroformo se evaporó completamente y se obtuvieron los lípidos que fueron pesados y a partir del peso de los mismos se calculó el porcentaje de lípidos de cada experimento empleando las siguientes ecuaciones:

$$LS = TCL - TCV$$

**Ecuación 3.**

Donde:

LS = peso de lípidos secos (g)

TCL = peso de tubo de cultivo con lípidos (g)

TCV = peso de tubo de cultivo vacío (g)

$$CL = \frac{LS}{TFBM_{15} - TFV_{15}} * 100$$

**Ecuación 4.**

Donde:

CL = contenido de lípidos (% p/p)

LS = peso de lípidos secos (g)

TFBM<sub>15</sub> = peso de tubos falcon de 15 mL con biomasa molida (g)

TFV<sub>15</sub> = peso de tubos falcon de 15 mL vacíos (g).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Crecimiento de Microalgas

En este proyecto de investigación se cultivaron microalgas de la especie *Chlorella* con el fin de crear un stock de cepas madre a ser utilizadas en los experimentos batch y semicontinuos para evaluar las condiciones adecuadas del crecimiento autotrófico de microalgas y su potencial para producción de biodiesel. Esta especie de microalga se caracteriza por su capacidad para acumular grandes cantidades de lípidos (56%) y por su rápido crecimiento (Serrano, 2012). El crecimiento de microalgas fue evaluado empleando dos medios diferentes: medio de proteosa utilizado para el crecimiento propiamente de las microalgas y el medio con fertilizante empleado para la reducción y prevención de contaminación de las cepas de microalgas con agentes externos como bacterias, con el fin de fortalecer las microalgas y permitir su desarrollo adecuado. Adicionalmente, se realizó una extracción de lípidos de una de las cepas para determinar el contenido de lípidos en las cepas puras. El crecimiento de las microalgas se evaluó en bioensayos batch. Los protocolos junto con las condiciones para el cultivo de las microalgas se encuentran descritos en la sección de Material y Métodos.

El monitoreo del crecimiento de las cepas de microalgas se evaluó a través de la medición de la absorbancia en longitudes de onda de 600, 680 y 750 nm. Las longitudes de onda de 600 y 680 nm fueron empleadas debido a que la clorofila presenta absorción en este rango del espectro electromagnético (González Velasco, 2009). En especial la clorofila a que es el principal pigmento que participa en la fotosíntesis y tiene una absorción principalmente a 680 nm (Lodish, y otros, 2006). Mientras que la absorbancia medida a longitudes de onda de 750 nm permite observar la concentración de biomasa en el medio de cultivo (Eliasson, Riemer, & Wokaun, 1999). A partir de las mediciones de

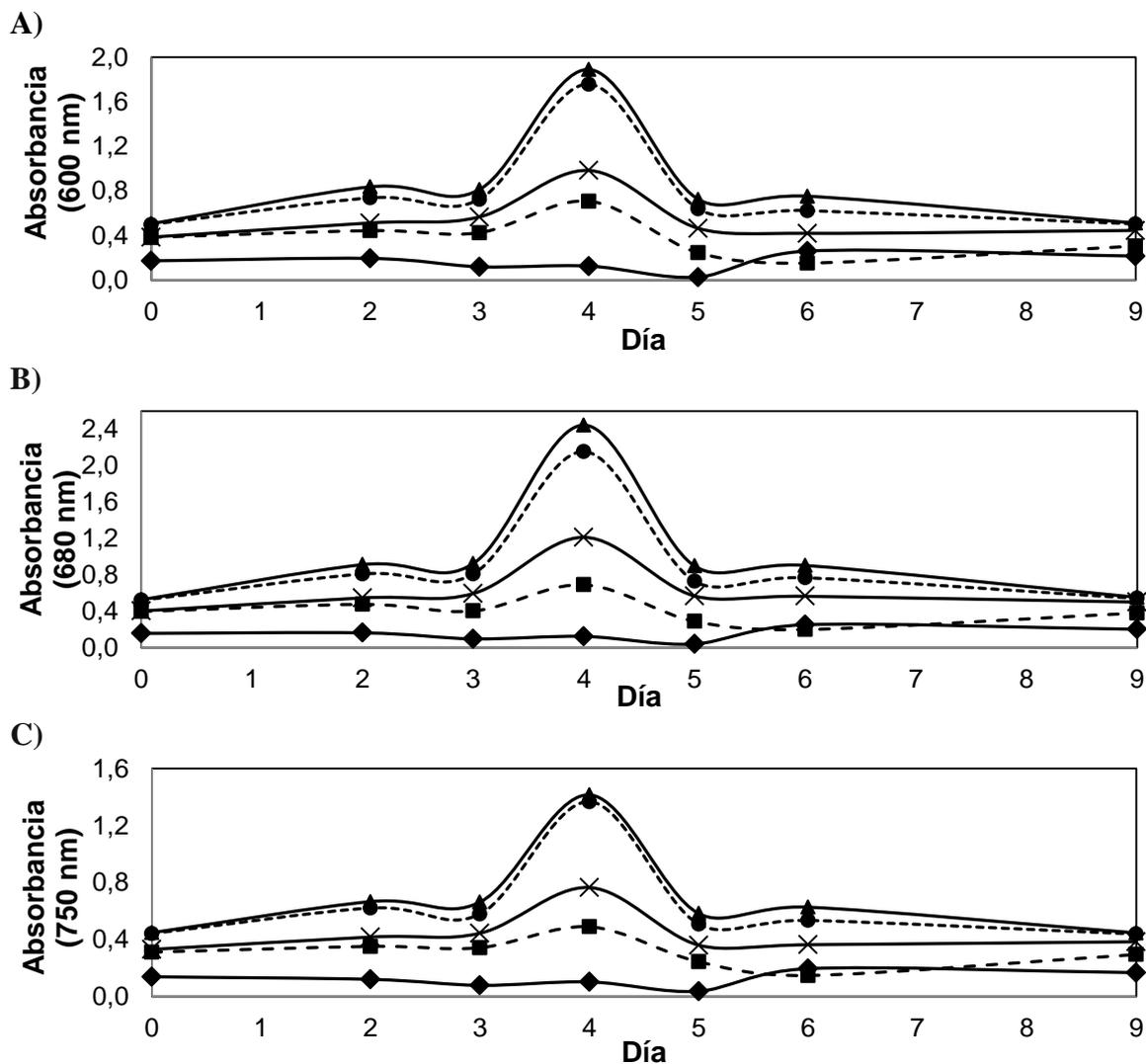
absorbancia se construyeron curvas de crecimiento de población algal para cada cepa con respecto al tiempo de cultivo.

En la Figura 6 se pueden observar las curvas de crecimiento a 600, 680 y 750 nm para cada cepa realizadas en un periodo de 9 días utilizando el medio de proteosa y bajo condiciones de crecimiento controladas. En general se puede observar que las curvas de crecimiento de población algal en las tres longitudes de onda evaluadas de las cepas EEUU, USA1, USA1+F y USA2 muestran la forma característica del crecimiento de las microalgas con cuatro fases de crecimiento. Para estas cepas, el crecimiento inició con una fase de latencia o adaptación al medio y a las condiciones de cultivo presentando un escaso incremento en la densidad celular y una duración de tres días; seguido por la fase de crecimiento exponencial en la cual la división celular se incrementó en función del tiempo, esta fase se observó del tercer al cuarto día; a continuación se observó una fase de decrecimiento exponencial de menos de un día; y finalmente se observó la fase de decaimiento o muerte en la cual la población de microalgas disminuye debido a la escasez de nutrientes en el medio de proteosa. Cabe resaltar que la forma de la curva de crecimiento de la población algal para la cepa Nativa no presenta las cuatro fases de crecimiento descritas para las otras microalgas evaluadas, por el contrario para esta cepa se puede observar un decaimiento del segundo al quinto día, un crecimiento ligero del quinto al sexto día y nuevamente un decaimiento ligero del sexto al noveno día de cultivo.

La literatura identifica cinco fases de crecimiento en las curvas de crecimiento de población algal que son latencia, crecimiento exponencial, decaimiento de crecimiento exponencial, estacionaria y de decaimiento o muerte (González, 2000). En el cultivo de las cepas puras no se observó la fase estacionaria, debido a que el tiempo de monitoreo no contó con la frecuencia requerida para poder evidenciar estos. En cuanto a la comparación

entre las curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de las tres diferentes absorbancias, en la Figura 6 se puede observar que las medidas de absorbancia registradas en las longitudes de onda 600 y 680 nm son similares entre sí, esto se sustenta en que estas longitudes de onda se mide la absorbancia de la clorofila a y b presente en las células de las microalgas (González Velasco, 2009), mientras que los rangos de absorbancia identificados en la longitud de onda de 750 nm se deben a la presencia de la biomasa (Eliasson, Riemer, & Wokaun, 1999). Los rangos de absorbancia alcanzados en la longitud de onda 600 nm por las diferentes cepas de microalgas fueron de: 0,03 a 0,26 (Nativa); 0,15 a 0,40 (EEUU); 0,51 a 1,89 (USA1); 0,39 a 0,98 (USA1+F) y 0,50 a 1,76 (USA2). En las mediciones de absorbancia en la longitud de onda de 680 nm, el rango para la cepa Nativa fue de 0,10 a 0,25, para la cepa EEUU fue de 0,20 a 0,47, para la cepa USA1 fue de 0,53 a 2,45, para la cepa USA1+F fue de 0,40 a 1,21 y para la cepa USA2 fue de 0,54 a 2,15 (USA2). Por otro lado, en las mediciones realizadas en longitud de onda de 750 nm se observaron los siguientes rangos de absorbancia en las diferentes cepas de: 0,08 a 0,20 (Nativa); 0,15 a 0,49 (EEUU); 0,45 a 1,42 (USA1); 0,33 a 0,77 (USA1+F) y 0,44 a 1,37 (USA2). En las curvas de crecimiento de población algal se identificaron absorbancias máximas en el cuarto día para las cepas EEUU, USA1, USA1+F y USA2, mientras que para la cepa Nativa no se observó una absorbancia máxima clara a lo largo de su curva de población algal. Las mediciones obtenidas en la longitud de onda 600 nm para las cepas de microalgas puras también fueron relacionadas con la densidad celular a través de la curva de calibración para *Chlorella vulgaris* realizada por Held (Held, 2011). Este autor, en su estudio sobre el monitoreo del crecimiento de algas usando propiedades intrínsecas, cultivó microalgas *Chlorella vulgaris* bajo condiciones similares a las empleadas para las cepas puras en este proyecto de investigación y desarrolló una curva de calibración de

absorbancia medida a 600 nm versus número de células por mililitro, la cual se presenta en el Anexo 1. En base a la curva de calibración para *Chlorella vulgaris* de Held, las densidades celulares máximas expresadas en millones de células por mililitro para cada cepa de microalgas evaluadas en este proyecto de investigación son aproximadamente de 130 (Nativa), 212 (EEUU), 1089 (USA1), 553 (USA1+F) y 1013 (USA2)  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  respectivamente. Estos datos son aproximados y que deberán ser tomados únicamente como referencia, por lo que se recomienda en estudios futuros realizar curvas de calibración propias en función de la absorbancia y la cantidad de células por mililitro para las cepas empleadas en esta investigación. En base a los resultados del cultivo de microalgas, las cepas de microalgas puras que se utilizaron para los experimentos posteriores fueron principalmente las cepas de microalgas USA1 y USA2 porque presentaron las mayores absorbancias en los tres rangos de longitudes de onda 600, 680 y 750 nm evaluadas, por lo tanto las mayores densidades celulares de todas las cepas estudiadas.

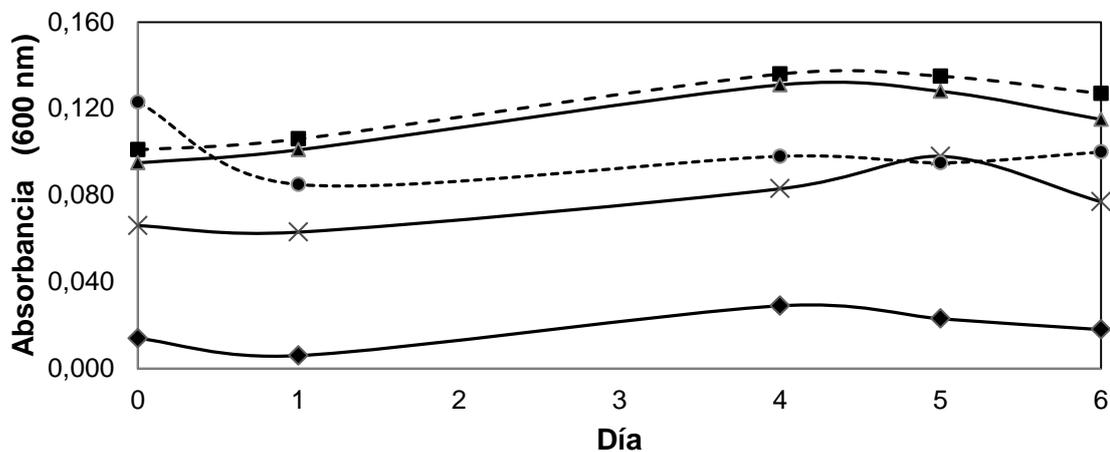


**Figura 6.** Curvas de crecimiento de población algal para cepas de microalgas cultivadas en medio de proteosa en un periodo de nueve días a 25°C, con un periodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y con agitación manual una vez al día. A) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 600 nm. B) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 680 nm. C) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 750 nm. Leyenda: (—●—) Nativa, (---■---) EEUU, (—▲—) USA 1, (---×---) USA1+F, (····♦····) USA 2.

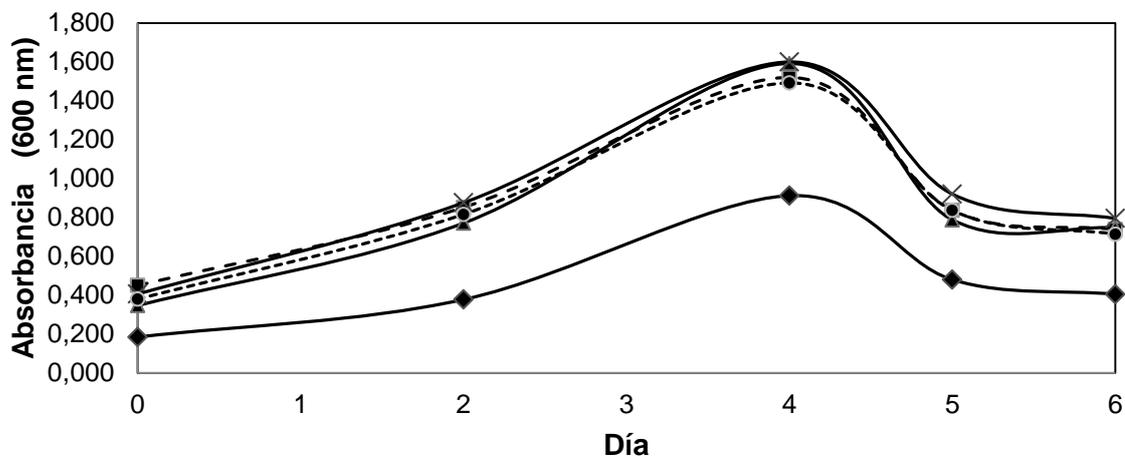
Algunas de las cepas puras de microalgas utilizadas en este proyecto de investigación no se encontraban saludables en el momento de su recepción debido a que su color en el medio de proteosa fue verde bajo o casi blanco característico de la falta de clorofila en las células de las microalgas (Lodish, y otros, 2006). Adicionalmente, en las curvas de crecimiento algal se observaron absorbancias con rangos bajos, lo cual está relacionado con una menor densidad celular (Lodish, y otros, 2006). Con el objetivo de recuperar las cepas de las microalgas, éstas fueron cultivadas en el medio con fertilizante que se caracterizó por tener como fuente de carbono el bicarbonato de sodio para el crecimiento autotrófico de las microalgas y por contener fertilizante que previene el crecimiento de bacterias durante el cultivo de las microalgas. En la Figura 7, se presentan las curvas de crecimiento de población algal cuando las microalgas no estaban saludables y cuando éstas se encontraban saludables y fortalecidas posterior a su cultivo en el medio con fertilizante. En las curvas de crecimiento de población algal cuando las microalgas se encuentran saludables se pueden identificar claramente cuatro fases: adaptación, crecimiento, decaimiento exponencial y decaimiento o muerte, registrando una absorbancia máxima en el cuarto día de cultivo; mientras que cuando las microalgas no se encuentran saludables, las curvas de crecimiento no presentan la forma típica de una curva de crecimiento algal y las absorbancias registradas son significativamente bajas. Los rangos de absorbancia en 600 nm para las microalgas no saludables fueron de: 0,006 a 0,03 para la cepa Nativa; 0,11 a 0,14 para la cepa EEUU; 0,10 a 0,13 para la cepa USA1; 0,06 a 0,10 para la cepa USA1+F y 0,09 a 0,12 para la cepa USA2. Mientras que los rangos de absorbancia para las microalgas saludables medidos a la misma longitud de onda 600 nm fueron de: 0,19 a 0,91 (Nativa); 0,45 a 1,52 (EEUU); 0,35 a 1,59 (USA1); 0,41 a 1,60 (USA1+F) y 0,38 a 1,49 (USA2). Adicionalmente, las absorbancias máximas registradas

en 600 nm para las microalgas que no encontraban saludables fueron de 0,03 (Nativa); 0,14 (EEUU); 0,13 (USA1); 0,10 (USA1+F) y 0,12 (USA2); mientras que cuando las microalgas se encontraban saludables se alcanzaron absorbancias máximas en su fase de crecimiento exponencial de 0,91 (Nativa), 1,52 (EEUU), 1,59 (USA1), 1,60 (USA1+F) y 1,49 (USA2) en la misma longitud de onda. Estos resultados claramente muestran la efectividad de utilizar el medio con fertilizante para fortalecer las cepas de microalgas, registrando incrementos en la densidad celular en los cultivos de cepas puras incremente en magnitudes de 30 (Nativa), 11 (EEUU), 12 (USA1), 16 (USA1+F) y 12 (USA2). Sin embargo, es importante indicar que si bien es cierto este medio fortaleció las cepas, no permitió su crecimiento, esto se concluyó al observar que los rangos de absorbancia se mantuvieron y no aumentaron cuando las microalgas se continuaban cultivando en el medio con fertilizante; por lo tanto una vez que se recuperaron las cepas puras, las microalgas fueron transferidas al medio de proteosa para evaluar su crecimiento autotrófico.

A)

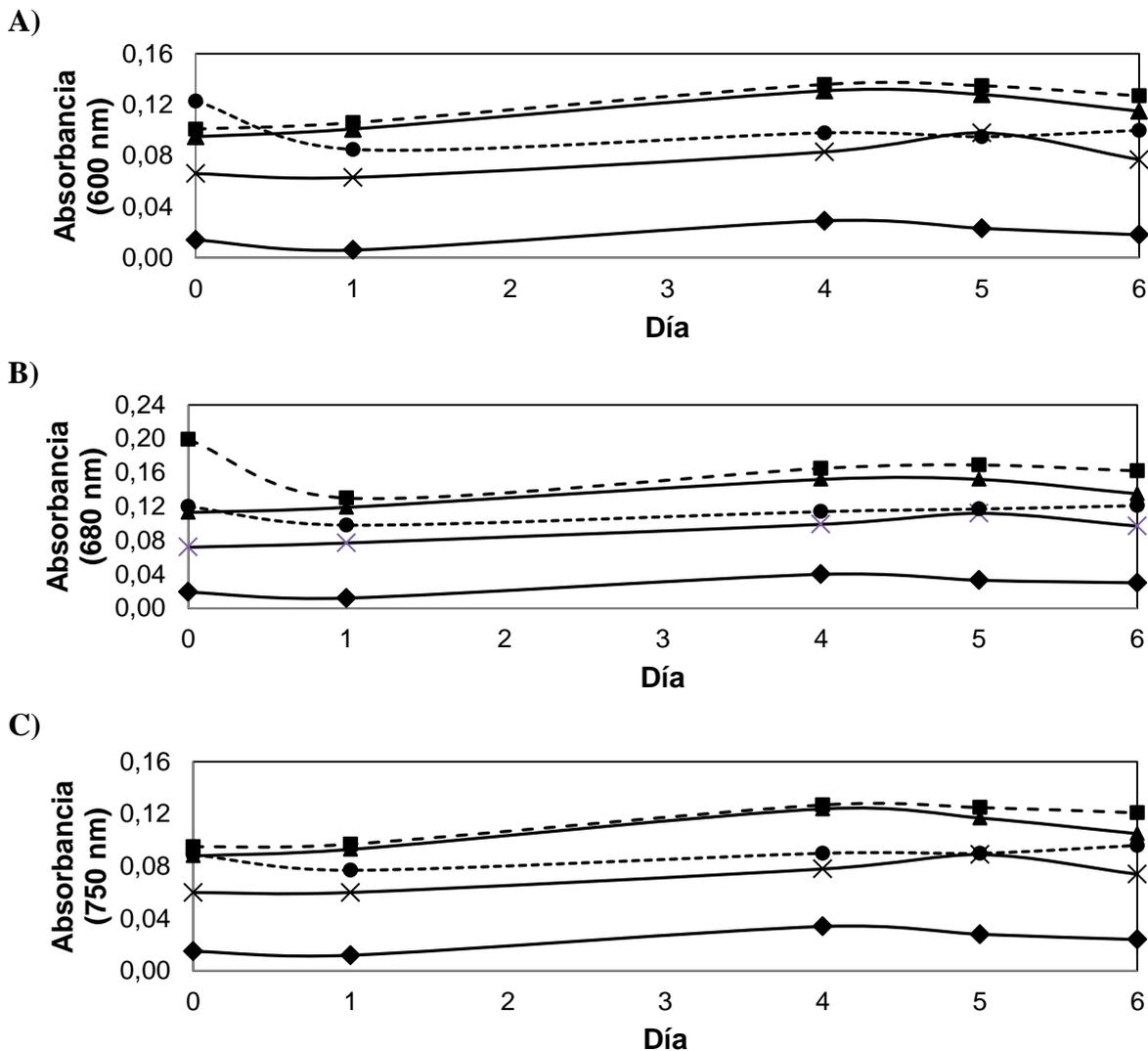


B)



**Figura 7.** Curvas de crecimiento de población algal para cepas de microalgas puras construidas a partir de mediciones de absorbancia de 600 nm. Microalgas cultivadas en 25°C, en un periodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad y con agitación manual una vez al día. A) Curvas de crecimiento de población algal de microalgas no saludables en medio de proteosa. B) Curvas de crecimiento de población algal de microalgas saludables, fortalecidas con medio con fertilizante. Leyenda: (◆) Nativa, (■) EEUU, (▲) USA 1, (×) USA1+F, (●) USA 2.

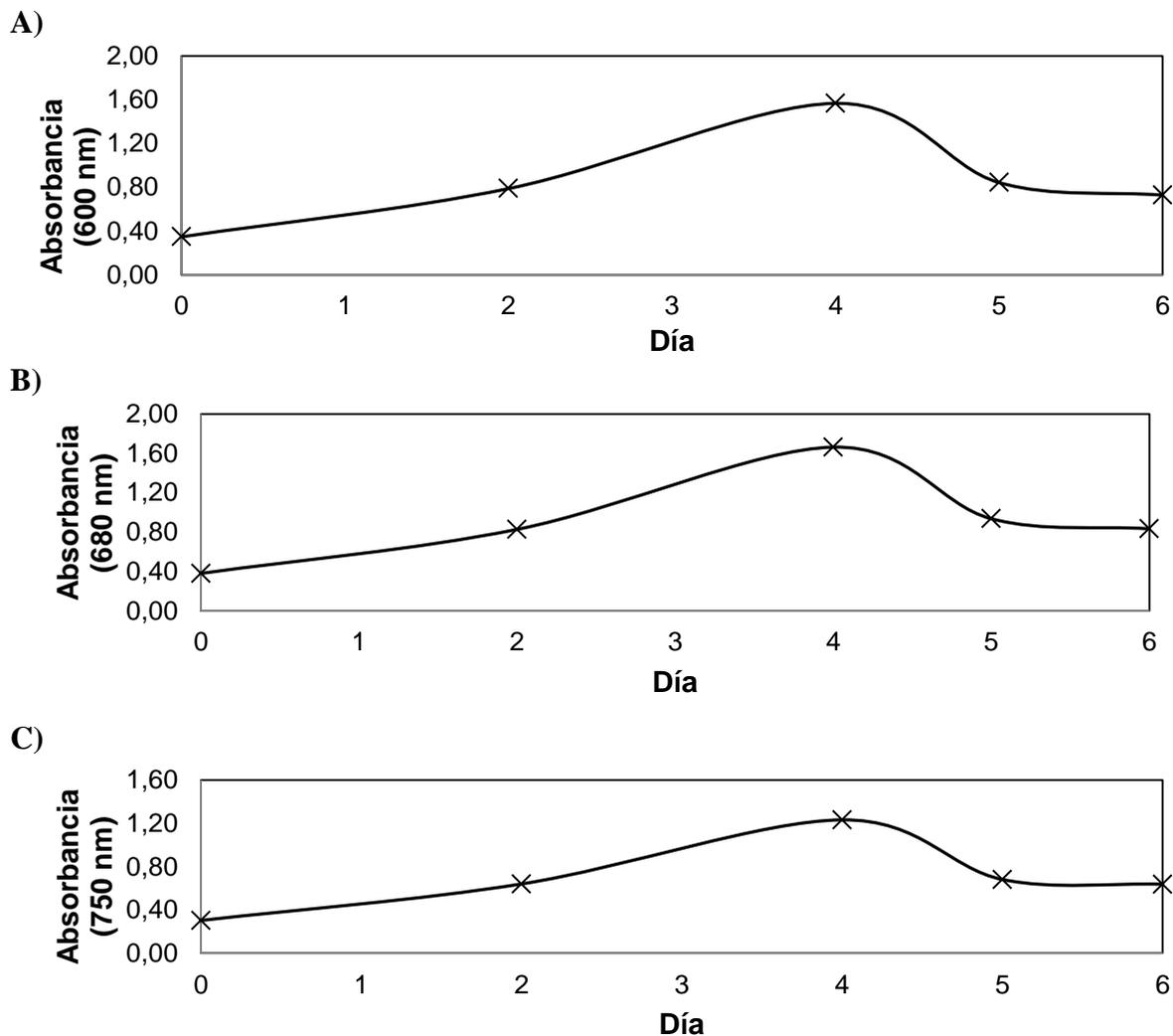
Durante el crecimiento o cultivo de las microalgas también se evaluó el tiempo en el cual las microalgas debían ser cosechadas para ser transferidas a un medio de cultivo fresco de tal manera que continúen creciendo. Las microalgas consumen los nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo para poder crecer, una vez que se han consumido todos los nutrientes disponibles, el crecimiento de las microalgas se detiene y esto provoca la liberando azúcares, proteínas, lípidos los cuales son aprovechados en algunos casos por bacterias oportunistas que se alimentan de estos compuestos desplazando a la población que aún se mantiene viva, pero que rápidamente colapsa (González, 2000). El tiempo de cosecha adecuado, es decir cuando existe una mayor cantidad de densidad celular, lo cual se presenta cuando la fase de crecimiento exponencial llega a su punto máximo e inicia la fase estacionaria, se identificó a través de las curvas de crecimiento de población algal. En la Figura 8 se presentan las curvas de crecimiento de población algal de las cepas puras Nativa, EEUU, USA1, USA1+F, USA2 y se identificó que las medidas de absorbancia se estabilizaron a partir del cuarto al sexto día, lo que permitió concluir que el cambio a medio fresco se debe realizar en este periodo.



**Figura 8.** Determinación de fase estacionaria en curvas de crecimiento de población algal para cepas de microalgas cultivadas en medio de proteosa en condiciones de temperatura de 25°C, en un periodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad y con agitación manual una vez al día. A) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 600 nm. B) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 680 nm. C) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 750 nm. Leyenda: (—●—) Nativa, (- ■ -) EEUU, (-▲-) USA 1, (-×-) USA1+F, (-◆-) USA 2.

Adicionalmente a la determinación de las curvas de crecimiento de población algal y del tiempo adecuado para cambio a medio de cultivo fresco, se realizó otro bioensayo para evaluar la concentración de biomasa en las microalgas puras utilizadas en esta investigación y el contenido de lípidos en las mismas. Este experimento, bajo condiciones batch, se realizó con la cepa pura USA1+F con medio de proteosa. La elección de esta cepa fue al azar entre todas las cepas disponibles para este proyecto de investigación con dos excepciones, la cepa Nativa que se consideró una cepa débil y la cepa USA2, que a pesar de que se encontraba en excelentes condiciones, no fue utilizada para mantenerla como reserva para futuros ensayos. La determinación de la biomasa y la extracción de lípidos se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos en la sección de Materiales y Métodos. En la Figura 9 se presentan las curvas de crecimiento de población algal para el experimento realizado con esta cepa USA1+F construidas con mediciones de absorbancia a longitudes de onda de 600, 680 y 750 nm. En el caso de la curva de crecimiento medida en una longitud de onda de 600 nm se puede observar que la absorbancia inicial fue 0,35 y ésta fue aumentando de forma exponencial hasta el cuarto día de cultivo en el cual se registró un valor máximo de 1,57, a partir de este día la absorbancia disminuyó rápidamente registrando un valor de 0,84 en el quinto día y de 0,73 en el sexto día de cultivo. Las formas de las curvas de crecimiento de población algal obtenidas a longitudes de onda de 680 y 750 nm presentan un comportamiento muy similar al descrito a 600 nm; sin embargo, existen variaciones en los valores de las absorbancias registradas que se discuten a continuación. En el caso de la curva de crecimiento determinada a 680 nm, las diferencias fueron que la absorbancia inicial fue 0,38 y la absorbancia máxima registrada en el cuarto día de cultivo fue 1,66; mientras que para la curva de crecimiento medida a 750 nm, las diferencias con la curva de crecimiento generada a 600 nm en términos de

absorbancias fueron que la absorbancia inicial fue 0,30 y la mayor absorbancia registrada en el cuarto día de cultivo fue 1,23. En términos generales, sugieren una alta densidad celular y una buena concentración de lípidos en las células de la cepa USA1+F. La concentración de biomasa determinada para la cepa USA1+F cultivada con medio de proteosa fue 0,66 g L<sup>-1</sup> y un contenido de lípidos de 8,30%. Estos resultados son menores a los reportados en la literatura, Liang y colaboradores en su estudio sobre la productividad de biomasa y lípidos de *Chlorella vulgaris* bajo condiciones de crecimiento autotróficas, heterotróficas y mixotróficas reportaron que el contenido de lípidos en las microalgas en condiciones de crecimiento autotróficas con el medio de proteosa fue de 38% (Liang, Sarkany, & Cui, 2009). Sin embargo, se debe recalcar que el contenido de lípidos en las células de la especie *Chlorella vulgaris* presenta un amplio rango de valores como se reporta en el estudio realizado por Gouveia y Oliveira sobre las microalgas como materia prima para producción de biodiesel, en el que se registran porcentajes de lípidos para esta especie entre 12y 55% (Yeh, Chang, & Chen, 2010)(Gouveia & Oliveira, 2009). Teniendo en consideración que el contenido de lípidos en las microalgas, no solo depende de la especie evaluada, sino también de las condiciones mismas de cultivo empleadas; los valores bajos registrados para la concentración de biomasa y porcentaje de lípidos de la cepa pura USA1+F sugieren que se evalúen las condiciones de crecimiento de las microalgas en más detalle, siendo uno de los parámetros más importantes la concentración de la fuente de carbono en el medio de cultivo.



**Figura 9.** Evaluación de concentración de biomasa y porcentaje de lípidos de la cepa pura USA1+F. Curvas de crecimiento de población algal cultivada en medio de proteosa en condiciones de temperatura de 25°C, en un periodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad y con agitación manual una vez al día. A) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 600 nm. B) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 680 nm. C) Curvas de crecimiento de población algal construidas a partir de mediciones de absorbancia de 750 nm. Leyenda: (x) USA1+F.

## **5.2 Cultivo Autotrófico de Microalgas en Bioensayos en Modo de Operación Batch**

El cultivo autotrófico de microalgas para la extracción de lípidos se realizó en bioensayos batch bajo condiciones controladas de operación. El objetivo de estos bioensayos fue evaluarla influencia de los parámetros de operación sobre la concentración de biomasa expresada como concentración de biomasa en  $\text{g L}^{-1}$  y el contenido de lípidos en las microalgas expresado como porcentaje de lípidos (% p/p). Los tres diferentes parámetros de operación estudiados fueron el tiempo de cultivo y día de cosecha de las microalgas, la concentración de bicarbonato de sodio en el medio de cultivo y el efecto de la agitación. En estos bioensayos se utilizó como medio de cultivo el medio de proteosa y se añadió concentraciones definidas de bicarbonato de sodio.

La influencia del tiempo de cultivo y la concentración de bicarbonato de sodio en la concentración de biomasa y contenido de lípidos se evaluó de manera preliminar con tiempos de cultivo de 6, 14 y 26 días; utilizando 50 mL de la cepa USA1+F en 200 mL del medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de 8 y  $43,39 \text{ g L}^{-1}$ . Las microalgas fueron cultivadas a  $25^{\circ}\text{C}$ , con periodos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, con agitación manual una vez al día. La determinación del contenido de biomasa y la extracción de lípidos se realizaron de acuerdo a los protocolos presentados en la sección de Materiales y Métodos.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de absorbancia final de los bioensayos a 600 nm, la concentración de biomasa y el porcentaje de lípidos de los bioensayos realizados con concentraciones de 8,00 y  $43,39 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio. Para los bioensayos realizados con  $8,00 \text{ g L}^{-1}$ , la concentración de la biomasa y el porcentaje de

lípidos se encuentran en rangos de 0,18 a 0,34 g L<sup>-1</sup> y de 2,76 a 5,67%, respectivamente; mientras que para los bioensayos realizados con una concentración de 43,39 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio se identificaron rangos de concentración de biomasa y porcentajes de lípidos entre 0,15 a 0,20 g L<sup>-1</sup> y 1,38 a 5,76%, respectivamente. En el caso de los bioensayos realizados con 8,00 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio, la máxima concentración de biomasa registrada fue 0,34 g L<sup>-1</sup> después de 26 días de cultivo y el mayor porcentaje de lípidos obtenido fue de 5,67% después de 6 días de cultivo. Para los bioensayos realizados con 43,39 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio se obtuvieron tanto la máxima concentración de biomasa, 0,20 g L<sup>-1</sup>, como el mayor porcentaje de lípidos, 5,73%, después de 26 días de cultivo. Estos resultados no presentan una tendencia clara en cuanto al efecto de la concentración de bicarbonato de sodio en la concentración de biomasa y el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. Sin embargo, las absorbancias finales en longitud de onda de 600 nm sugieren que mientras más baja la concentración de bicarbonato de sodio mayor es la concentración de biomasa, así como también mientras menor es el tiempo de cultivo, mayor es la absorbancia la cual está relacionada con el contenido de biomasa en los ensayos. En base a estos resultados se decidió realizar experimentos con rangos menores de concentraciones de bicarbonato de sodio y menores tiempos de cultivo.

Los resultados obtenidos en este proyecto de investigación coinciden con los reportados en la literatura, los cuales muestran que concentraciones elevadas de bicarbonato de sodio inhiben el crecimiento de las microalgas. En el estudio realizado por Barghbani y colaboradores se investigó sobre el efecto de la concentración de bicarbonato de sodio en el medio de cultivo sobre el crecimiento de las microalgas *Chlorella vulgaris*, observando que para una concentración de 6,00 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio la densidad

celular fue de  $0,50 \text{ g L}^{-1}$ , mientras que para una concentración de  $3,00 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio la densidad celular fue de  $1,10 \text{ g L}^{-1}$ , es decir, aproximadamente el doble (Barghbani, Rezaei, & Javanshir, 2012). Adicionalmente, los estudios reportados en la literatura establecen que menores tiempos de cultivo, optimizan la extracción de lípidos de las microalgas. Por ejemplo, en el estudio realizado por Jeong y colaboradores se encontró que la mayor densidad óptica, 1,80, para microalgas cultivadas en un medio con bicarbonato de sodio se alcanzó en el cuarto día de cultivo (Jeong, Gillis, & Hwang, 2003). Sostaire y colaboradores, en su estudio sobre el crecimiento de las microalgas *Chlorella vulgaris* en un medio de cultivo con diferentes fuentes de carbono, identificaron que la mayor densidad celular, mayor contenido de clorofila a y mayor porcentaje de lípidos se presentó alrededor del quinto día de cultivo (Sostaire, Golob, Bricelj, Klinar, & Pivec, 2009).

**Tabla 3.** Evaluación preliminar de la influencia del tiempo de cultivo y concentración de bicarbonato de sodio en la concentración de biomasa y contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. Bioensayos batch realizados a 25°C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y tiempo de cultivo de 6, 14 y 26 días, utilizando 50 mL de la cepa USA1+F en 200 mL de medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de 8 y 43,39 g L<sup>-1</sup>.

<b>Experimentos</b>	<b>Concentración de Bicarbonato de sodio (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tiempo de cultivo (d)</b>	<b>Absorbancia final (600 nm)</b>	<b>Concentración de Biomasa (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Contenido de Lípidos (%)</b>
<b>EXP 1</b>	8,00	6	0,35	0,18	5,67
<b>EXP 2</b>		14	0,30	0,20	2,76
<b>EXP 3</b>		26	0,21	0,34	3,76
<b>EXP 4</b>	43,39	6	0,25	0,15	3,46
<b>EXP 5</b>		14	0,25	0,15	1,38
<b>EXP 6</b>		26	0,23	0,20	5,76

La efectividad del tiempo de cosecha y de la concentración de bicarbonato de sodio en la optimización de la concentración de biomasa y el porcentaje de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas fueron evaluadas empleando menores tiempos de cultivo (4 y 6 días) y rangos bajos de concentración de bicarbonato de sodio ( $0,05$  a  $8 \text{ g L}^{-1}$ ). Estos bioensayos fueron realizados bajo condiciones de operación batch con la cepa USA1+F y se incluyeron tres controles libres de bicarbonato de sodio. El cultivo de las microalgas, la obtención de la biomasa y la extracción de lípidos se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos en la sección de Materiales y Métodos.

En la Figura 10 se presenta una fotografía de los lípidos extraídos en los bioensayos batch de cultivo autotrófico de microalgas realizados con concentraciones de bicarbonato de sodio de  $0,10$ ;  $0,50$ ;  $1,00$ ;  $5,00$  y  $8,00 \text{ g L}^{-1}$ .

Los resultados de la absorbancia final registrada, la concentración de biomasa y el contenido de lípidos para los bioensayos realizados con  $0,00$ ;  $0,05$ ;  $0,075$ ;  $0,10$ ;  $0,50$ ;  $1,00$ ;  $5,00$  y  $8,00 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio se presentan en la Tabla 4. En el caso de los controles (ausencia de bicarbonato de sodio) la concentración de biomasa y la extracción de lípidos se calcularon a partir de un promedio de los valores obtenidos para los tres controles realizados.

En cuanto a la tendencia de los resultados se puede observar en términos generales que tanto la concentración de biomasa como el porcentaje de lípidos aumentaron conforme aumentó la concentración de bicarbonato de sodio en los rangos menores, desde  $0,05$  hasta  $0,10 \text{ g L}^{-1}$ , por ejemplo, el porcentaje de lípidos aumentó de  $6,08\%$  con una concentración de  $0,05 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio a  $7,72\%$  con una concentración de  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio. En los bioensayos realizados con concentraciones de bicarbonato de sodio mayores a  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  tanto la concentración de la biomasa como el contenido de

lípidos disminuyeron, por ejemplo, el porcentaje de lípidos con una concentración de bicarbonato de sodio de  $0,50 \text{ g L}^{-1}$  fue de 6,30%, es decir, menor a la mencionada previamente para  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio. En el caso de los controles (ausencia de bicarbonato de sodio) la concentración de biomasa fue de  $0,34 \text{ g L}^{-1}$  y el porcentaje de lípidos extraído fue de 5,95%, valores son menores a todos los experimentos realizados en esta sección como se puede observar en la Tabla 4. Esta tendencia se esperaba, debido a que el medio de cultivo de los controles no tuvo bicarbonato de sodio que representa la fuente de carbono que permite que las microalgas se desarrollen.

En base a estos resultados se determinó que bajo condiciones evaluadas de cultivo autotrófico de microalgas, la mayor concentración de biomasa,  $0,43 \text{ g L}^{-1}$ , y el mayor contenido de lípidos, 7,72%, se obtuvieron en el bioensayo realizado con una concentración de bicarbonato de sodio de  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  y con un tiempo de cultivo de 6 días.



**Figura 10.** Fotografía de lípidos extraídos de experimentos batch para evaluación de efectividad de tiempo de cultivo (4 y 6 días) y concentración de bicarbonato de sodio en la concentración de biomasa y contenido de lípidos. Experimentos con concentraciones de bicarbonato de sodio (de izquierda a derecha): 0,10; 0,50; 5,00; 8,00 g L<sup>-1</sup> (Fotografía tomada por Ana Gabriela Dávila).

**Tabla 4.** Evaluación de la efectividad del tiempo de cultivo y concentración de bicarbonato de sodio en rangos menores en la concentración de biomasa y contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. Bioensayos batch realizados a 25°C, con ciclos de luz y de oscuridad de 12 horas y tiempo de cultivo 4 y 6 días, utilizando 50 mL de cepa pura USA1+F en 200 mL de medio de cultivo de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio entre 0,05 y 8,00 g L<sup>-1</sup>.

<b>Experimento</b>	<b>Concentración de Bicarbonato de sodio (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tiempo de cultivo (d)</b>	<b>Absorbancia final (600 nm)</b>	<b>Concentración de Biomasa (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Contenido de Lípidos (%)</b>
<b>Control</b>	0,000	4	0,24	0,34	5,95
<b>EXP 7</b>	0,050		0,34	0,38	6,08
<b>EXP 8</b>	0,075		0,31	0,38	6,44
<b>EXP 9</b>	0,10	6	0,44	0,43	7,72
<b>EXP 10</b>	0,50		0,42	0,39	6,30
<b>EXP 11</b>	1,00		0,36	0,39	6,88
<b>EXP 12</b>	5,00		0,41	0,38	7,08
<b>EXP 13</b>	8,00		0,36	0,39	6,86

Los resultados de la concentración de biomasa y el contenido de lípidos durante el crecimiento autotrófico de microalgas en rangos menores de concentración de bicarbonato de sodio ( $0,05 - 8,00 \text{ g L}^{-1}$ ) y tiempos de cultivo (4 y 6 días) son mayores en comparación con los resultados obtenidos en la evaluación preliminar con concentraciones de bicarbonato de sodio ( $8,00$  y  $43,39 \text{ g L}^{-1}$ ) y tiempos de cultivo mayores descritos previamente. Por ejemplo en el caso de la evaluación preliminar se obtuvo el mayor porcentaje de lípidos ( $5,76\%$ ) con una concentración de biomasa de  $0,20 \text{ g L}^{-1}$  bajo una concentración de bicarbonato de sodio de  $43,39 \text{ g L}^{-1}$  y 26 días de cultivo. Mientras que en el bioensayo realizado en esta sección con una concentración de bicarbonato de sodio de  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  y tiempo de cultivo de 6 días se obtuvo una concentración de biomasa de  $0,43 \text{ g L}^{-1}$  y un porcentaje de lípidos de  $7,72\%$ ; es decir, un porcentaje de lípidos 1,3 veces mayor que el mejor obtenido en la evaluación preliminar. Sin embargo, la concentración de biomasa es menor a la reportada en la literatura. Por ejemplo, Jeong y colaboradores en su estudio sobre la mitigación del dióxido de carbono mediante la fotosíntesis de las microalgas reportaron una densidad óptica de 1,8 medida a 680 nm. Este valor es cuatro veces mayor a la densidad óptica obtenida en esta investigación, 0,44, bajo las mismas condiciones de cultivo. De igual manera, el porcentaje de lípidos obtenidos en los bioensayos realizados en esta investigación continúa siendo menor al reportado en la literatura para experimentos con *Chlorellas* en medios de cultivo con bicarbonato de sodio. Por ejemplo, para una concentración de bicarbonato de sodio de  $0,075 \text{ g L}^{-1}$  se obtuvo un porcentaje de lípidos de  $6,44\%$ ; mientras que Devgoswami y colaboradores, en su estudio sobre el crecimiento de *Chlorella*, *Haematococcus* y *Scenedesmus sp.* en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio y dióxido de carbono,

reportaron un porcentaje de lípidos de 27% para la misma concentración de bicarbonato de sodio de  $0,075 \text{ g L}^{-1}$  (Devgoswami C. , Kalita, Talukdar, Bora, & Sharma, 2011).

La efectividad de la agitación también fue evaluada bajo condiciones de operación controladas para optimizar el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. La agitación permite tener una mejor transferencia de masa y en este proyecto de investigación se evaluaron tres técnicas de agitación: agitación manual una vez al día, agitación con un agitador de barra magnética (Agitador Magnético HI301N, Hanna Instruments Inc., U.S.A) a una velocidad de 280 rpm y agitación con un agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) a una velocidad de 225 rpm con control de temperatura.

En el primer bioensayo para agitación se comparó la efectividad de la agitación manual con la agitación con barra magnética, con un tiempo de cultivo de 4 días y utilizando 100 mL de cepa pura USA1+F en 200 mL de medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de 0,10; 1,00 y 10,00  $\text{g L}^{-1}$ . En la Figura 11 se presenta una fotografía de los bioensayos batch realizados con agitación manual una vez al día en la parte frontal y los bioensayos con agitación con barra magnética (Agitador Magnético HI301N, Hanna Instruments Inc., U.S.A) a una velocidad de 280 rpm en la parte posterior.



**Figura 11.** Fotografía de bioensayos batch para evaluarla efectividad de la agitación manual y la agitación con barra magnética en el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. En la parte frontal se observan los experimentos con agitación manual una vez al día y en la parte posterior los experimentos con agitación con barra magnética (Agitador Magnético HI301N, Hanna Instruments Inc., U.S.A) a una velocidad de 280 rpm. Los bioensayos se mantuvieron a una temperatura de 25°C, con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y un tiempo de cultivo de cuatro días. Los experimentos fueron realizados con 100 mL de la cepa USA1+F y alimentados con 200 mL de medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio (de izquierda a derecha): 0 (control), 0,10; 1,00 y 10,00 g L<sup>-1</sup>. (Fotografía tomada por Ana Gabriela Dávila).

En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos para evaluar el efecto de la agitación en el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas en los bioensayos realizados con agitación manual y con agitación con barra magnética. No se presentan los resultados para el experimento que se realizó con agitación manual y con concentración de bicarbonato de sodio en el medio de  $1,00 \text{ g L}^{-1}$ , debido a errores experimentales registrados durante el proceso de extracción de lípidos. Para la absorbancia final registrada en los experimentos se observó mayores absorbancias con los experimentos sometidos a agitación con barra magnética en comparación a los agitados manualmente; además, al realizar una comparación entre la absorbancia final e inicial de cada bioensayo, el porcentaje de incremento de la biomasa dentro de cada bioensayo fue mayor para el experimento realizado con una concentración de bicarbonato de sodio  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  sometido a agitación con barra magnética. En cuanto a la concentración de la biomasa en este caso se presentan los resultados como concentración de biomasa seca en peso molida, a diferencia de los otros bioensayos en los que la biomasa fue pesada previo a la molienda. La concentración de biomasa máxima,  $0,45 \text{ g L}^{-1}$ , se registró para el experimento realizado con una concentración de bicarbonato de sodio de  $10,00 \text{ g L}^{-1}$  con agitación con barra magnética; sin embargo, en este experimento se registró un contenido de lípidos de apenas 2,95%. Cabe recalcar que durante la extracción de biomasa se toman en cuenta también las microalgas muertas que claramente no contienen lípidos. El mayor porcentaje de lípidos (11,03%) se identificó en el bioensayo con una concentración de bicarbonato de sodio de  $0,10 \text{ g L}^{-1}$ . Se observó una disminución en el porcentaje de lípidos de aproximadamente el 50% o más conforme se aumentó o disminuyó la concentración de bicarbonato de sodio en el medio de cultivo. En cuanto a la comparación entre experimentos con agitación manual y con agitación con barra magnética, no se observó una tendencia clara en la influencia de

la técnica de agitación en el contenido de lípidos. Mientras que en los experimentos realizados en ausencia de bicarbonato de sodio y con una concentración de bicarbonato de sodio de  $10,00 \text{ g L}^{-1}$  se observó que la agitación con barra magnética perjudica la concentración de lípidos, disminuyendo este porcentaje de 7,96 a 5,49% y de 4,34 a 2,95%, respectivamente; en el caso del cultivo autotrófico con una concentración de bicarbonato de sodio de  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  se observó que con agitación manual el porcentaje de lípidos, 5,76%, fue menor que el obtenido con agitación con barra magnética, 11,03%. Como se observa no se puede establecer una tendencia clara sobre la influencia de la agitación en el contenido de lípidos y debido a esto se decidió aplicar otra técnica de agitación con un agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A).

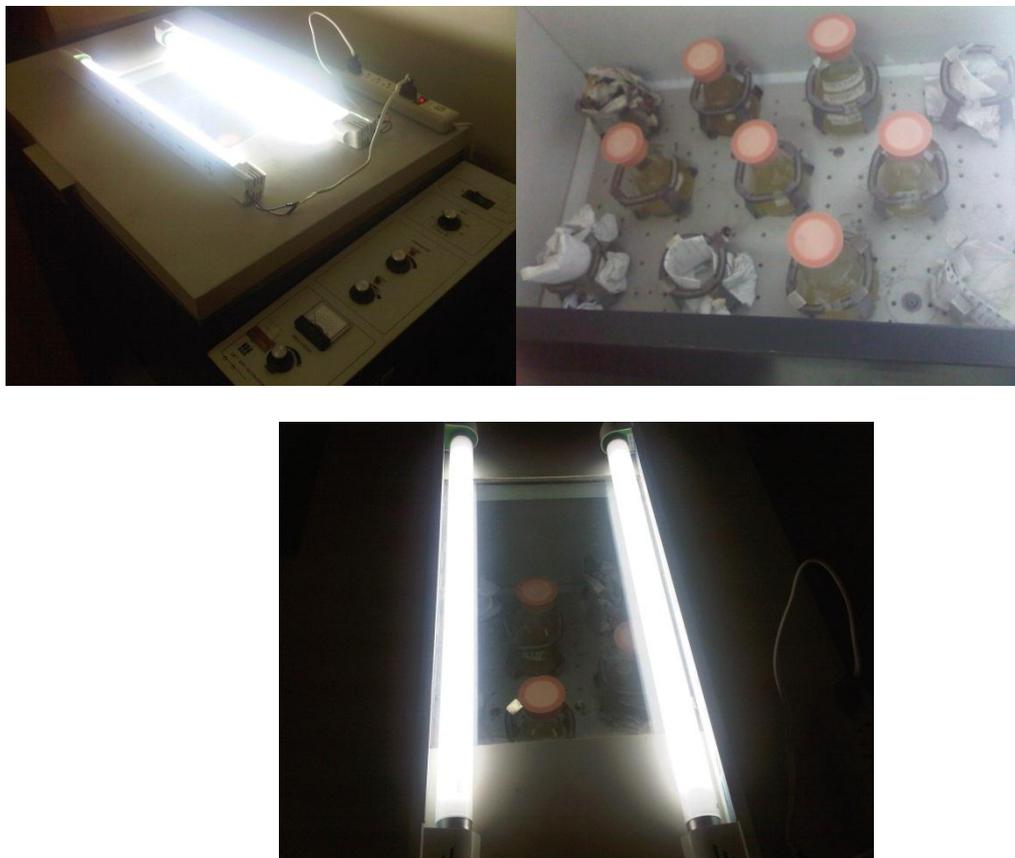
**Tabla 5.** Evaluación de la efectividad de agitación manual, realizada una vez al día, y agitación con barra magnética (Agitador Magnético HI301N, Hanna Instruments Inc., U.S.A) a una velocidad de 280 rpm en el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. Bioensayos batch realizados a 25°C, ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y tiempo de cultivo de 4 días, utilizando 100 mL de cepa pura USA1+F en 200 mL de medio de cultivo de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de 0,00; 0,10; 1,00 y 10,00 g L<sup>-1</sup>.

<b>Experimento</b>	<b>Concentración de Bicarbonato de sodio (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Agitación</b>	<b>Absorbancia final (600 nm)</b>	<b>Concentración de Biomasa (g L<sup>-1</sup>)*</b>	<b>Contenido de Lípidos (%)</b>
<b>EXP 14</b>	0,00	Manual	0,39	0,23	7,96
<b>EXP 15</b>	0,00	Magnética	0,41	0,31	5,49
<b>EXP 16</b>	0,10	Manual	0,37	0,25	5,76
<b>EXP 17</b>	0,10	Magnética	0,44	0,28	11,03
<b>EXP 18</b>	1,00	Magnética	0,41	0,27	5,93
<b>EXP 19</b>	10,00	Manual	0,43	0,30	4,34
<b>EXP 20</b>	10,00	Magnética	0,46	0,45	2,95

\* Concentración de biomasa en peso seco calculada a partir de la biomasa molida. La concentración de la biomasa seca molida corresponde a un 90 – 99.6% de la biomasa total seca.

En el segundo bioensayo se evaluó la influencia de la agitación permanente con agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) en el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de las microalgas. Los bioensayos fueron realizados utilizando 50 mL de la cepa pura USA2 en 200 mL de medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de 0,10 y 10,0 g L<sup>-1</sup>. Adicionalmente, se utilizó un control sin bicarbonato de sodio. En la Figura 12 se presentan fotografías de los bioensayos realizados empleando el agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A).

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para evaluar el efecto de la agitación en el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas en los bioensayos realizados empleando el agitador orbital. En el caso de la concentración de biomasa se observó que para los bioensayos con bicarbonato de sodio (0,10 y 10,00 g L<sup>-1</sup>) se obtuvo la misma cantidad de biomasa, 0,20 g L<sup>-1</sup>; sin embargo, la absorbancia final registrada para el bioensayo con una concentración 0,10 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio (0,34) fue mayor que para el experimento realizado con una concentración de 10,0 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio (0,25), lo que sugiere un error durante la extracción de biomasa del primer bioensayo. En el control se obtuvo una concentración de 0,26 g L<sup>-1</sup> de biomasa. El contenido de lípidos de los bioensayos fue similar para el caso del control y del bioensayo realizado con 10,00 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio, 2,79 y 2,62%, respectivamente; mientras que del bioensayo realizado con una concentración de 0,10 g L<sup>-1</sup> se extrajo un contenido de lípidos de 3,16%, es decir, aproximadamente 1,15 veces mayor que el de los otros bioensayos. Los resultados de absorbancia final registrada y contenido de lípidos sugirieron que la condición adecuada de cultivo era con una concentración de 0,10 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio.



**Figura 12.** Fotografía de bioensayos para evaluarla efectividad de agitación con agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) en el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. En la parte superior izquierda se presenta el agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) con las lámparas OSRAM de luz fluorescente blanca fría como fuente de luz para el crecimiento de las microalgas. En la parte superior derecha se observan los erlenmeyers cubiertos con tapas de esponja y con las microalgas dentro del agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A). En la parte inferior se muestra una fotografía superior del bioensayo. Los bioensayos se mantuvieron a una temperatura de 25°C, ciclo de luz de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y un tiempo de cultivo de 6 días. Los experimentos fueron realizados con 50 mL de cepa USA2 y alimentados con 200 mL de medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de: 0,00 (control), 0,10 y 10,00 g L<sup>-1</sup> (Fotografía tomada por: Ana Gabriela Dávila).

Los resultados obtenidos sobre el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas en estos bioensayos fueron similares a aquellos reportados previamente con diferentes concentraciones bicarbonato de sodio para los ensayos con agitación manual y agitación con barra magnética en términos del efecto de la concentración de bicarbonato de sodio, es decir, que la concentración adecuada de bicarbonato de sodio era  $0,10 \text{ g L}^{-1}$ . Sin embargo, en los bioensayos realizados con  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio a penas se extrajo un porcentaje de lípidos de 3,16%. Este porcentaje de lípidos fue menor al registrado en el bioensayo realizado previamente con la misma concentración de bicarbonato de sodio y agitación con barra magnética (Agitador Magnético HI301N, Hanna Instruments Inc., U.S.A) a una velocidad de 280 rpm (11,03%). Esto se debe a que las microalgas utilizadas en los experimentos con agitación con agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) no se encontraban muy saludables y esto afecta en los resultados del contenido de lípidos, debido a esto no se puede concluir que la una técnica de agitación es mejor que la otra. Más allá, al comparar con la literatura, los porcentajes de lípidos en estos bioensayos colocados en un agitador orbital con una concentración dada de bicarbonato de sodio son significativamente menores a los obtenidos por Yeh y colaboradores que reportaron porcentajes de lípidos entre 30 y 40% para *Chlorella vulgaris* ESP-31 cultivada en un medio con  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  en un agitador orbital (Yeh, Chang, & Chen, 2010). En conclusión en cuanto a la agitación no se registró una efectividad marcada de las diferentes técnicas de agitación evaluadas en esta investigación por lo tanto se decidió continuar con la agitación con agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A), por la facilidad de su utilización y porque permite tener un control de la temperatura más exacto mediante un regulador.

Finalmente, en base a los resultados del cultivo autotrófico de microalgas bajo condiciones de operación batch con diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio, tiempos de cultivo y tipos de agitación se pudo concluir que la mayor concentración de biomasa y el mayor contenido de lípidos se obtuvo con una concentración de bicarbonato de sodio en el medio de proteosa de  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  con un tiempo de cultivo de 4 días y con agitación suministrada a través de un agitador orbital para evitar problemas de transferencia de masa.

**Tabla 6.** Evaluación de la efectividad de agitación con agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) en el contenido de lípidos durante el cultivo autotrófico de microalgas. Bioensayos batch realizados a 25°C, ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y tiempo de cultivo de 4 días, utilizando 50 mL de la cepa USA2 en 200 mL de medio de cultivo de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de 0,00; 0,10 y 10,00 g L<sup>-1</sup>.

<b>Experimento</b>	<b>Concentración de Bicarbonato de sodio (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Absorbancia final (600 nm)</b>	<b>Concentración de biomasa (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Contenido de Lípidos (%)</b>
<b>Control</b>	0,00	0,14	0,26	2,79
<b>EXP 21</b>	0,10	0,34	0,20	3,16
<b>EXP 22</b>	10,00	0,25	0,20	2,62

### **5.3 Cultivo Autotrófico de Microalgas en Bioensayos en Modo de Operación Semicontinuo**

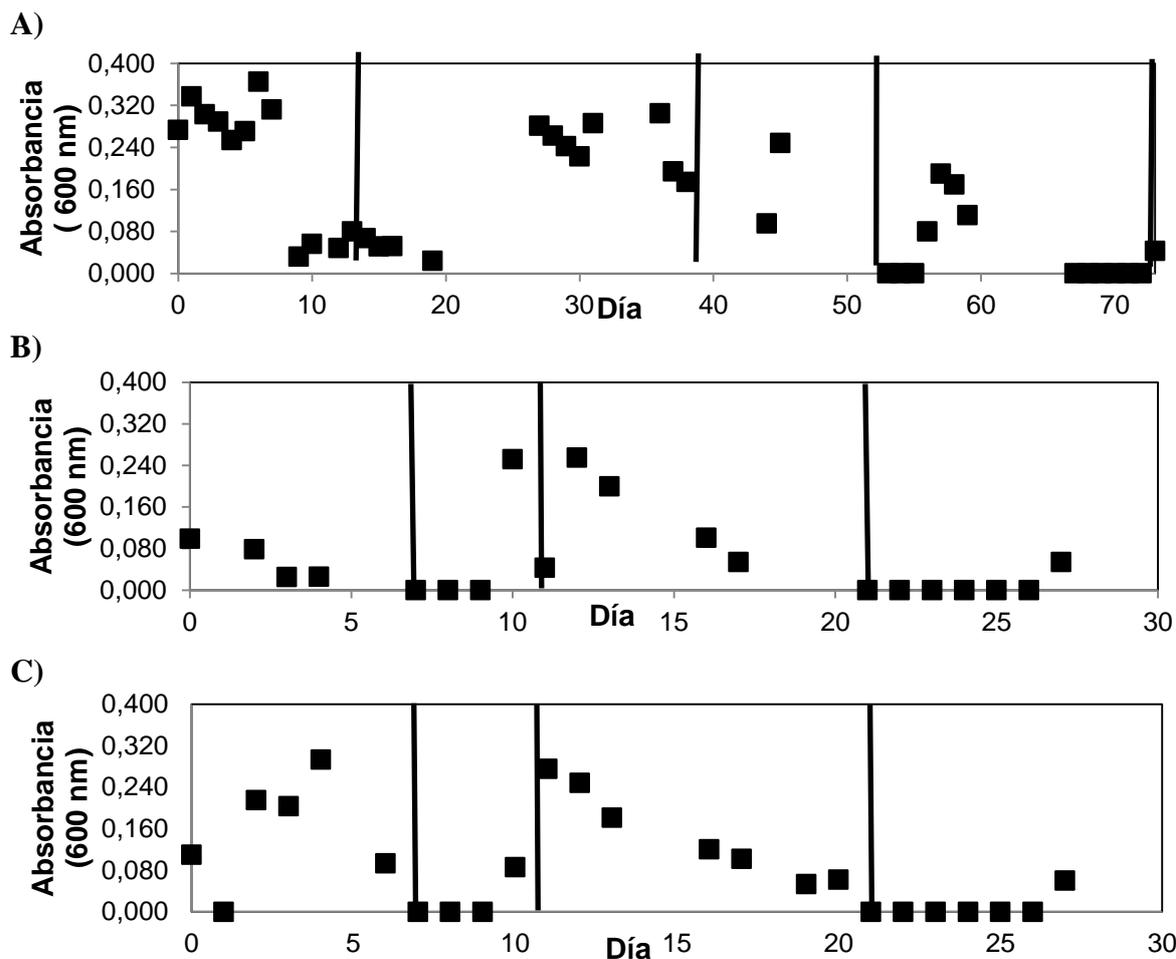
Los experimentos realizados en esta sección tienen como objetivo evaluar la efectividad del cultivo autotrófico de microalgas de la especie USA2 bajo condiciones de operación semicontinuas en la concentración de biomasa y contenido de lípidos en las microalgas en términos de la concentración de bicarbonato de sodio y la frecuencia de extracción de lípidos. Además, estos experimentos corresponden a una fase preliminar para el cultivo autotrófico de microalgas en un fotobiorreactor, bajo condiciones de operación controladas descritas más adelante.

Los bioensayos semicontinuos se realizaron bajo condiciones controladas descritas en Materiales y Métodos a una temperatura de 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y se mantuvieron en un agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) a una velocidad de 225 rpm. Los bioensayos se realizaron con un volumen de 100 mL de la cepa USA2 para el experimento semicontinuo 1 (SM1) y con 50 mL de la cepa USA2 para los experimentos semicontinuo 2 (SM2) y semicontinuo 3 (SM3) y con 200 mL de medio de proteosa con concentraciones de bicarbonato de sodio de 0,10 g L<sup>-1</sup> para los experimentos SM1 y SM2 y 1 g L<sup>-1</sup> para el experimento SM3. Posteriormente, 400 mL de medio se agregaron conforme el crecimiento de población algal alcanzaba su fase estacionaria o terminaba la fase de crecimiento exponencial establecidas a través del monitoreo de las absorbancias, la adición del medio se realizó hasta alcanzar aproximadamente un volumen total de 1 L.

En lo referente a la frecuencia de extracción de lípidos en el caso del experimento SM1 se tomaron muestras de 200 mL previo a agregar el medio de cultivo fresco para

poder evaluar la concentración de biomasa y contenido de lípidos periódicamente, mientras que en el bioensayo SM2 solo se realizó una extracción de lípidos final una vez que el bioensayo concluyó. Para el monitoreo del crecimiento de la población algal, la concentración de biomasa y extracción de lípidos se utilizaron los protocolos descritos en Materiales y Métodos.

Las mediciones de absorbancias realizadas para los tres experimentos en modo de operación semicontinuo a una longitud de onda de 600 nm se muestran en la Figura 13. Las mediciones de absorbancia para el experimento SM1 desde el inicio del experimento hasta el séptimo día de cultivo muestran rangos entre 0,25 y 0,37; mientras que del día 9 al día 16 se registran rangos de absorbancia de 0,03 a 0,05. Debido a que los rangos de absorbancia disminuyeron, en el día 13 se añadieron 400 mL de medio de proteosa con 0,1 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio. Cabe indicar que en este día solo se agregó medio fresco de cultivo y no se tomó muestra para extracción de lípidos. A partir de este día los rangos de mediciones de absorbancia aumentaron hasta 0,31 en el día 36. Nuevamente se añadieron 400 mL de medio en los días 39 y 52. En lo referente al experimento SM2, las mediciones de absorbancia no fueron valores elevados a lo largo del bioensayo como se puede observar en la Figura 13, de hecho los valores máximos registrados fueron 0,25 y 0,26, en el décimo y doceavo día, respectivamente. En el caso del experimento SM3 tampoco se alcanzaron rangos elevados de absorbancia a lo largo del cultivo de las microalgas, registrando un valor máximo de 0,29 en el cuarto día; sin embargo, se observó una tendencia desde el día 7 al 20 muy similar a la curva de crecimiento de población algal típica.



**Figura 13.** Monitoreo de absorbancias en longitud de onda de 600 nm para experimentos semicontinuos temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y agitación en agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A). A) Experimento SM1 con concentración de bicarbonato de sodio en medio de proteosa de 0,1 g L<sup>-1</sup> y extracciones de lípidos periódicas. B) Experimento SM2 con concentración de bicarbonato de sodio en medio de proteosa de 0,1 g L<sup>-1</sup> y extracción de lípidos final. C) Experimento SM3 con concentración de bicarbonato de sodio en medio de proteosa de 1 g L<sup>-1</sup> y extracción de lípidos final. Leyenda: (■) mediciones de absorbancias, las líneas verticales indican los días en los que se tomaron 200 mL de muestra para extracción de lípidos en el caso del experimento SM1 y los días en los que se agregaron 400 mL de medio de cultivo fresco en todos los experimentos (SM1, SM2 y SM3).

En la Tabla 7 se presentan los resultados de absorbancia final registrada, concentración de biomasa y contenido de lípidos en los tres experimentos realizados en modo de operación semicontinuo con diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio y frecuencia de extracción de lípidos. En cuanto a la concentración de biomasa, en el caso del bioensayo SM3 con una concentración de bicarbonato de sodio de  $1,00 \text{ g L}^{-1}$  la concentración de biomasa fue  $0,1369 \text{ g L}^{-1}$ , este valores mayor que aquellos registrados para los otros bioensayos en modo de operación semicontinuo SM1 y SM2,  $0,1285$  y  $0,1227 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Sin embargo, en lo referente al porcentaje de lípidos en los diferentes bioensayos se observa que con una concentración de bicarbonato de sodio de  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  en los bioensayos SM1 y SM2 se extrajeron aproximadamente el doble de lípidos,  $6,89$  y  $6,38\%$ , respectivamente, en comparación con el bioensayo SM3 realizado con una concentración de bicarbonato de sodio de  $1,00 \text{ g L}^{-1}$  en el que se registró una concentración de lípidos de  $3,32\%$ ; confirmando nuevamente que la concentración de bicarbonato de sodio adecuada para optimizar el contenido de lípidos en las microalgas es  $0,10 \text{ g L}^{-1}$ .

En comparación al bioensayo realizado en modo de operación batch con el agitador orbital empleando la misma concentración de bicarbonato de sodio,  $0,10 \text{ g L}^{-1}$ , se registró una concentración de biomasa mayor que en los experimentos en modo de operación semicontinuo SM1 y SM2. En estos bioensayos(SM1 y SM2) la concentración de biomasa fue  $0,1285$  y  $0,1227 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente; mientras que en el experimento en modo de operación batch fue  $0,200 \text{ g L}^{-1}$ . Sin embargo, esta tendencia no se observó en cuanto al contenido de lípidos. El contenido de lípidos en los bioensayos SM1 y SM2 fue  $6,89$  y  $6,38\%$ , respectivamente, siendo estos valores aproximadamente el doble que el contenido de lípidos registrado en el bioensayo batch que fue de  $3,16\%$ .

Con respecto a la frecuencia de extracción de lípidos, el contenido de lípidos obtenido mediante extracciones periódicas en el bioensayo SM1 fue 6,31% en el día 38 de cultivo, 6,13% en el día 52 de cultivo y 6,89% en el día 73 de cultivo al finalizar el bioensayo. Estos resultados no muestran una tendencia entre el incremento del contenido de lípidos en las microalgas con respecto al tiempo de cultivo. Más allá, el contenido de lípidos en la extracción final del bioensayo SM1, es similar al del bioensayo SM2, 6,38%, en cual solo se realizó una única extracción al finalizar el experimento.

En conclusión se determinó que la concentración de bicarbonato de sodio adecuada para el cultivo autotrófico de microalgas fue  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  y se recomienda realizar una única extracción final una vez que el bioensayo haya concluido. Finalmente, el diseño del proceso de montaje y operación del fotobiorreactor se aplicó el sistema de agitación mediante bombeo de aire que se utiliza actualmente por la mayoría de autores y en la mayoría de fotobiorreactores (Barghbani, Rezaei, & Javanshir, 2012), como lo mencionan los autores Spoehe y Milner, en su estudio de los efectos de las condiciones ambientales en la composición química de las *Chlorellas*, la agitación causada por el bombeo de aire previene la sedimentación de las microalgas en el fondo del biorreactor (Spoehe & Milner, 1948).

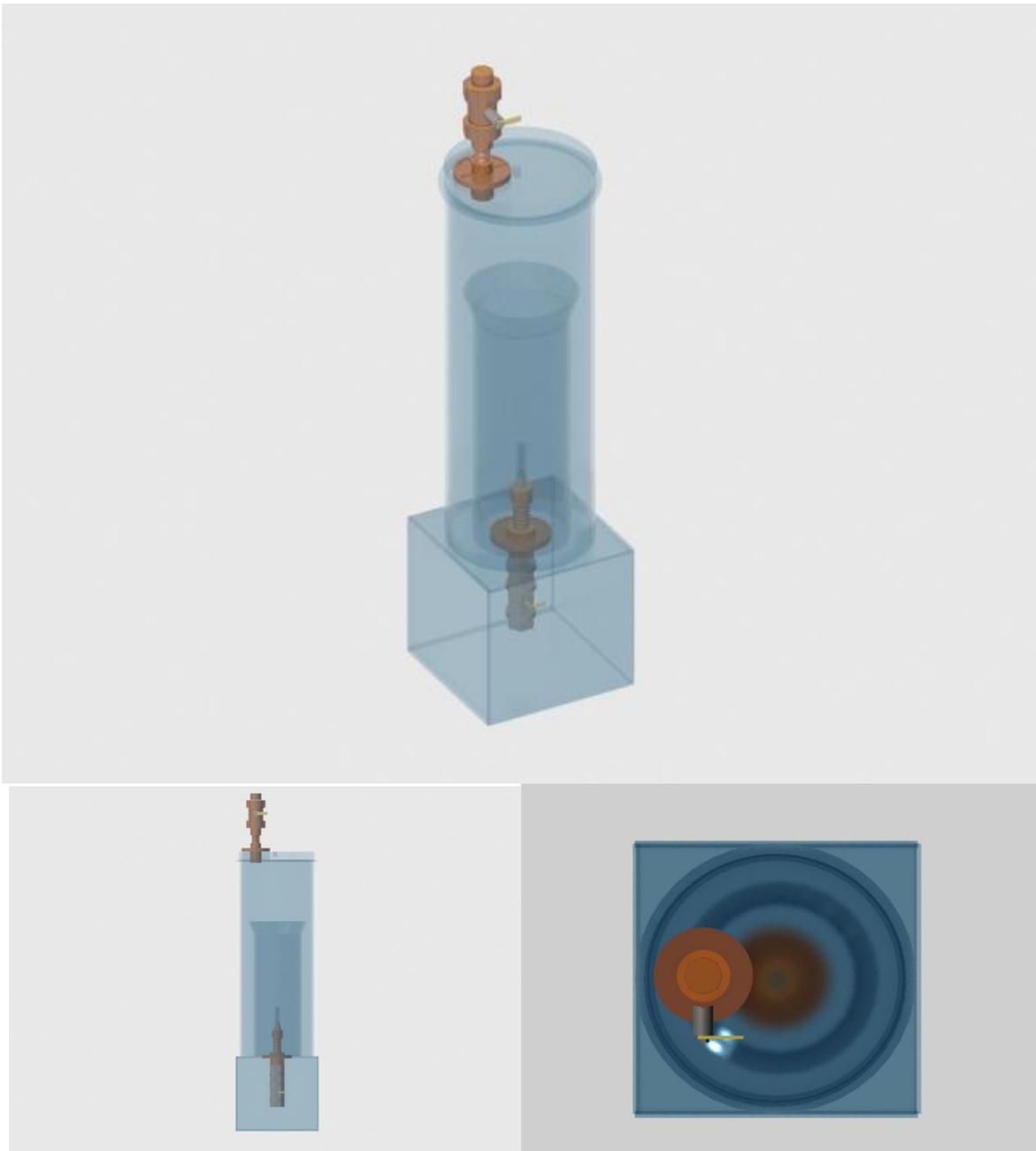
**Tabla 7.** Absorbancia final registrada, concentración de biomasa y contenido de lípidos en experimentos realizados bajo condiciones de operación semicontinuas a 25°C, con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y agitación con agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) en medio de proteosa con diferentes concentraciones de bicarbonato de sodio.

<b>Experimento</b>	<b>Concentración de Bicarbonato de Sodio (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Absorbancia final (600 nm)</b>	<b>Concentración de Biomasa (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Contenido de Lípidos (%)</b>
<b>SM1</b>	0,1	0,04	0,13	6,89
<b>SM2</b>	0,1	0,05	0,12	6,38
<b>SM3</b>	1	0,06	0,14	3,32

## **5.4 Diseño del Proceso de Instalación y Operación de un Fotobiorreactor Tubular**

El diseño del proceso de instalación y operación se realizó para un fotobiorreactor diseñado y construido por el Dr.-Ing. Ródney Peñafiel en la Universidad San Francisco de Quito. Una representación del fotobiorreactor tubular se muestra en la Figura 14 y un dibujo a escala del fotobiorreactor se presenta en el Anexo 2. El fotobiorreactor tubular construido en plexiglas con un volumen de 10 litros, está compuesto de un cilindro exterior y uno interior, por este último ingresa aire mediante bombeo en la parte inferior del cilindro, y un soporte sobre el cual se apoyan los dos cilindros. En la parte superior del biorreactor se encuentra una salida de aire regulable, un orificio para toma de muestras pequeñas y una tapa para toma de muestras de volúmenes grandes o vaciado del fotobiorreactor, en la parte inferior existe una llave para regular la cantidad de aire que ingresa al biorreactor. Este tipo de fotobiorreactores ha sido utilizado desde hace mucho tiempo por científicos para estudiar la producción de microalgas a gran escala con el fin de producir biodiesel a partir de ellas. El primer fotobiorreactor fue diseñado por Cook en la Universidad de Standford a finales de 1940 y muchos reactores han sido diseñados a partir de éste (Tredici, 2004). Por ejemplo, Chiu y colaboradores utilizaron un fotobiorreactor con flujo de aire ascendente para el cultivo de microalgas y remoción de dióxido de carbono (Chiu, Tsai, Kao, Ong, & Lin, 2009), del mismo modo Prassone y colaboradores utilizaron dos fotobiorreactores de flujo de aire ascendente con agua salada y agua dulce, y con diferentes sistemas de iluminación para estudiar la producción de biomasa a partir de microalgas(Prassone, Cattaneo, Di Termini, Rovatti, Panatto, & Rovatti). El objetivo del diseño del proceso de instalación y operación del fotobiorreactor tubular fue optimizar la

concentración de microalgas y el contenido de lípidos en las mismas. Este proceso fue desarrollado en base a los resultados de los bioensayos de cultivo autotrófico de microalgas descritos previamente, debido a que como lo menciona Tredici, el diseño para un funcionamiento eficiente de un fotobiorreactor no se puede realizar adecuadamente sin el conocimiento de la fisiología en cultivo masivo de los organismos que van a ser cultivados (Tredici, 2004).



**Figura 14.** Representación del fotobiorreactor diseñado por el Dr.-Ing. Ródney Peñafiel. En la parte superior se observa una representación en 3d del fotobiorreactor y en la parte inferior una representación frontal (izquierda) y una representación de su parte superior (derecha). Representación realizada por Francisco Lara y Ana Gabriela Dávila utilizando el programa para diseño 3ds MAX de Autodesk.

Los criterios que se consideraron para el diseño del proceso de instalación y operación del fotobiorreactor tubular fueron el suministro de fuente de carbono, provisión de luz, mezclado, control de temperatura, control del crecimiento celular, control de la concentración de biomasa y contenido de lípidos, y eliminación del oxígeno en forma de gas dentro del fotobiorreactor. A continuación se describen las consideraciones tomadas dentro cada criterio para la instalación y operación del fotobiorreactor.

#### **5.4.1 Instalación.**

Previo a la instalación del fotobiorreactor se debe lavar muy bien éste con agua y jabón, desinfectarlo con cloro y lavarlo nuevamente con agua destilada para evitar la contaminación del cultivo de las microalgas. Adicionalmente, previo al montaje del biorreactor se deben realizar 5 experimentos en modo de operación semicontinuo en las mismas condiciones de cultivo en las que se realizó el experimento SM2 con la cepa pura que en ese momento se encuentre más saludable. Estos experimentos representarán la fuente de microalgas para el cultivo de las mismas en el fotobiorreactor. Estos experimentos deben ser cultivados primero en medio con fertilizante hasta alcanzar absorbancias mayores a 2 en una longitud de onda de 600 nm para fortalecer a las microalgas, y posteriormente éstas deben ser cultivadas en medio de proteosa con una concentración de bicarbonato de sodio de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ . Durante el montaje del fotobiorreactor tubular los 5 experimentos en modo de operación semicontinuo, se colocarán en el fotobiorreactor una vez que las lámparas OSRAM de luz fluorescente blanca fría hayan sido colocadas como se describe en la sección de Provisión de Luz.

### **5.4.2 Suministro de Fuente de Carbono.**

El suministro de la fuente de carbono al fotobiorreactor tubular se realizará de manera semicontinua. La fuente de carbono para el crecimiento de las microalgas será el bicarbonato de sodio. El fotobiorreactor será alimentado con medio de proteosa y una concentración de bicarbonato de sodio de  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ . La frecuencia de alimentación del fotobiorreactor se realizará en base a la curva de crecimiento de población algal, cuando esta curva alcance el punto máximo de crecimiento exponencial y empiece a decaer se debe tomar una muestra de 200 mL para la extracción de lípidos y se debe agregar medio de cultivo fresco en la misma cantidad.

### **5.4.3 Provisión de Luz.**

La provisión de luz es uno de los factores más importantes en el crecimiento de las microalgas y su efectividad se evalúa en términos del crecimiento de las microalgas, concentración de biomasa y contenido de lípidos. En el fotobiorreactor tubular propuesto para este proyecto de investigación se utilizarán las mismas lámparas empleadas en los bioensayos batch y semicontinuos descritos previamente, lámparas OSRAM fluorescentes blanca fría de 20 W con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad controlados con un temporizador Heavy Duty Timer (Intermatic, Illinois, U.S.A). Sin embargo, se recomienda determinar experimentalmente la luz por metro cuadrado para el fotobiorreactor tubular y comparar este valor con los rangos recomendados en la literatura.

En base al alcance de la luz dentro del fotobiorreactor se conocen dos zonas, la zona fótica y la zona oscura. La superficie exterior que está expuesta a la luz se conoce como la zona fótica, debido a que las microalgas que se encuentran en esta zona absorben la luz, la cantidad de microalgas que realizan esto depende de la concentración de la

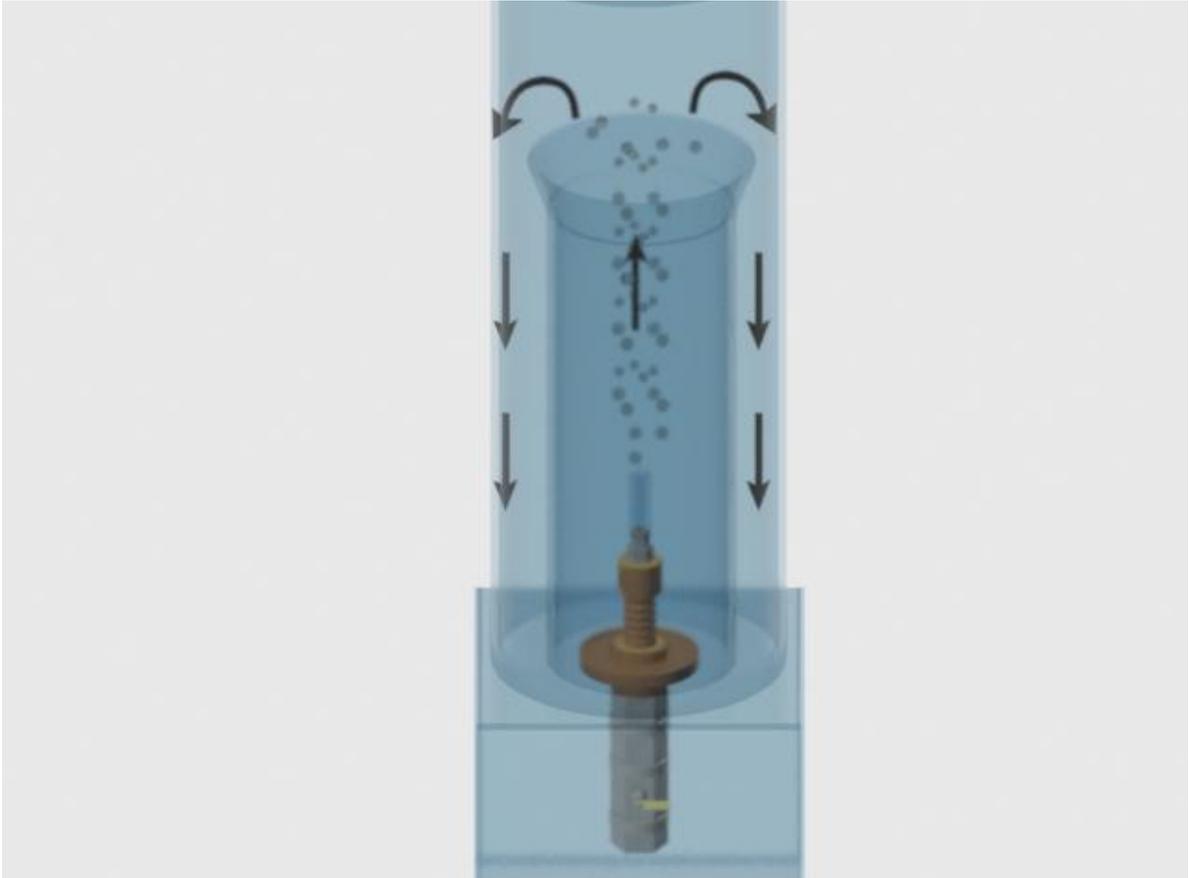
biomasa dentro del fotobiorreactor; mientras que la parte interna del fotobiorreactor se conoce como la zona de oscuridad (Janssen, 2002). Para reducir esta última zona es que se han creado fotobiorreactores con luz interna o esta zona puede reducirse mediante el bombeo de aire que promueve que las microalgas viajen de la zona de oscuridad a la zona fótica (Janssen, 2002). Es importante tomar en cuenta este factor durante el funcionamiento del fotobiorreactor, debido a que en estos casos el gradiente de luz es bajo no se está aprovechando toda la luz y la densidad celular será muy baja como para ser comercialmente atractiva (Janssen, 2002).

La manera adecuada de proveer luz a los fotobiorreactores ha sido investigada por varios autores, por ejemplo Tredici y colaboradores desarrollaron un fotobiorreactor con iluminación interna a través de tubos o lámparas fluorescentes dentro del cilindro interno del fotobiorreactor (Tredici, 2004). En el fotobiorreactor propuesto para este proyecto de investigación se colocarán cuatro lámparas OSRAM de luz fluorescente blanca fría y paneles de papel aluminio alrededor del fotobiorreactor para reflejar la luz de las lámparas y optimizar el uso de éstas, como lo recomendó el Dr.-Ing. Ródney Peñafiel. Adicionalmente, de considerarse necesario se puede colocar una lámpara en la parte superior del fotobiorreactor para reducir la zona oscura del mismo.

#### **5.4.4 Mezclado.**

El mezclado es un factor importante dentro del cultivo de microalgas en un fotobiorreactor, porque es necesario para evitar la sedimentación de las microalgas en el fondo del biorreactor, evitar estratificación termal, romper la difusión de gradientes en la superficie de las células y permitir una distribución de nutrientes uniforme (Janssen, 2002). Todos estos factores juntos permiten una mayor productividad del fotobiorreactor. En el fotobiorreactor propuesto para esta investigación, el mezclado se realizará por medio de

bombeo de aire desde la parte inferior del cilindro interno, a lo largo de él y se difundirá por el cilindro exterior (Figura 15). La velocidad del bombeo de aire debe determinarse experimentalmente para no producir un efecto adverso en las células de las microalgas, existe una velocidad máxima de agitación que se puede utilizar y esto depende de las microalgas cultivadas, una agitación excesiva puede causar estrés hidrodinámico en el cultivo causando un daño en las células de las microalgas (Mazzuca Sobczuk, García Camacho, Molina Grima, & Yusuf Chisti, 2006).



**Figura 15.** Bombeo de aire desde la parte inferior del fotobiorreactor diseñado por el Dr.-Ing. Ródney Peñafiel con una bomba de aire. Movimiento de las microalgas desde la zona de oscuridad (interior) a la zona fótica (superficie) (Representación realizada por Francisco Lara y Ana Gabriela Dávila).

#### **5.4.5 Control de temperatura.**

La concentración de las microalgas se puede optimizar cuando se identifica la temperatura de cultivo adecuada para el desarrollo de las microalgas (Tredici, 2004). La temperatura adecuada para el crecimiento de *Chlorella* es 25°C, como se mencionó previamente. Para el control de la temperatura en el fotobiorreactor se utilizará un orificio pequeño en la parte superior del mismo, introduciendo un termómetro u otro medidor de temperatura que se crea conveniente. El dispositivo que se utilice para medir la temperatura debe ser esterilizado previamente para evitar el ingreso de agentes externos en el cultivo de microalgas. El control de la temperatura se deberá realizar como mínimo una vez al día.

#### **5.4.6 Control del crecimiento celular.**

El crecimiento celular en el fotobiorreactor tubular se realizará utilizando el mismo protocolo descrito previamente en Materiales y Métodos. Las muestras que se tomarán para medir las absorbancias serán de 4 mL como mínimo y se tomarán con una pipeta automática Biopette A (Labnet International Inc., Woodbridge, U.S.A) de 1 mL. En base a las mediciones de absorbancia a longitudes de onda de 600, 680 y 750 nm se construirán las curvas de crecimiento de población algal con las cuales se evaluará el crecimiento de las microalgas como se realizó en los experimentos descritos previamente en este proyecto de investigación. Las medidas de absorbancia deben ser menores a 3 o de lo contrario se deben realizar diluciones para reducir errores en la exactitud de las mediciones. Chiu y colaboradores en su estudio sobre la utilización de un fotobiorreactor con flujo de aire para un cultivo de alta densidad de microalgas y remoción de dióxido de carbono recomiendan

diluir la muestra para obtener valores máximos de absorbancia de 1 (Chiu, Tsai, Kao, Ong, & Lin, 2009).

#### **5.4.7 Control de la concentración de biomasa y contenido de lípidos.**

El control de la concentración de biomasa y contenido de lípidos se realizará a través de muestras periódicas de 200 mL del cultivo del fotobiorreactor tubular. Las muestras se tomarán en base a la curva de crecimiento de población algal y se tomarán por la parte superior del fotobiorreactor quitando la tapa y teniendo cuidado de trabajar en un ambiente lo más estériles posible. La concentración de biomasa y contenido de lípidos se evaluará siguiendo los protocolos presentados en la sección de Materiales y Métodos de este estudio.

#### **5.4.8 Eliminación del oxígeno en forma de gas.**

La acumulación de oxígeno generado por la fotosíntesis de las microalgas en el fotobiorreactor representa un factor limitante en el escalamiento del cultivo de microalgas (Tredici, 2004). Concentraciones de oxígeno disuelto equivalentes a cuatro o cinco veces la saturación de oxígeno en el aire son tóxicas para muchos fotótrofos (Tredici, 2004) y pueden ser alcanzadas fácilmente en este tipo de sistemas. Por ejemplo, en un reactor de 1 cm de diámetro a máximas tasas de fotosíntesis se puede acumular de 8 a 10 mg de oxígeno  $L^{-1} \text{ min}^{-1}$  (Tredici, 2004).

Dentro del fotobiorreactor se permitirá la liberación de oxígeno por medio de la salida de oxígeno regulable ubicada en la parte superior, la cantidad de oxígeno que se debe dejar salir, debe ser determinada experimentalmente.

## 6. CONCLUSIÓN

En este proyecto de investigación se determinaron las condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento autotrófico de microalgas *Chlorella* con el fin de maximizar el porcentaje de lípidos para la potencial producción de biodiesel. Microalgas *Chlorella* se cultivaron en medio con fertilizante para su fortalecimiento y en medio con proteosa para su crecimiento. Las condiciones de operación que incluyeron concentración de bicarbonato de sodio en el medio de cultivo, tiempo de cultivo, agitación y la frecuencia de extracción de lípidos fueron identificadas exitosamente en experimentos en modo de operación batch y semicontinuo. Una vez identificadas estas condiciones de operación se realizó el diseño del proceso de instalación y operación de un fotobiorreactor tubular para cultivo autotrófico de microalgas escala piloto. Futuras investigaciones deben realizarse con el fin de estudiar otras condiciones de cultivo que afectan la concentración de biomasa y contenido de lípidos en las microalgas como son la temperatura y la iluminación de los cultivos. Adicionalmente, se recomienda realizar una curva de calibración propia en términos de la absorbancia y las células por mililitro para poder realizar un análisis más preciso del crecimiento de las microalgas.

En el país, las investigaciones sobre la generación de biodiesel deberían direccionarse hacia el cultivo de microalgas en aguas residuales domésticas o industriales. Esta tecnología presenta un gran potencial, no solo porque permite cultivar las microalgas para generación de biodiesel, sino también tratar aguas residuales que en la actualidad representan un problema ambiental en Ecuador. En el futuro la generación a gran escala de biocombustibles en el país debe ir acompañada de políticas socio-ambientales que promuevan su uso y la selección de tecnologías de producción que mitiguen los impactos ambientales y sociales establecidos mediante un análisis de ciclo de vida.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Administration, U. E. (2010). *Independent Statistics & Analysis*. Obtenido de U.S. Energy Information Administration:  
<http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/iedindex3.cfm?tid=79&pid=alltypes&aid=1&cid=ww,&syid=2001&eyid=2010&unit=TBPD>
- Andrade, M., & Costa, J. (s.f.). *Mixotrophic cultivation of microalga Spirulina platensis using molasses as organic substrate*. Brasil: Federal University Foundation of Río Grande.
- Barghbani, R., Rezaei, K., & Javanshir, A. (2012). Investigating the Effects of Several Parameters on the Growth of *Chlorella vulgaris* Using Taguchi's Experimental Approach. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 1, 128-133.
- Bozbas, K. (2005). Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 1-12.
- Buyx, A., & Tait, J. (2012). Ethical Framework for Biofuels. *Science*, 332, 540-541.
- Carriquiry, M., Du, X., & Timilsina, G. (2010). *Second-Generation Biofuels*. The World Bank Development Research Group.
- Chappell, J., Allnut, T., Sayre, R., Olivares, J., Tidwell, J., Das, K., y otros. (s.f.). *Innovation, Infrastructure and Human Capital Development for Commercializing Algal Biofuels and Biomaterials In Southeastern U.S.A.*
- Cheng, Y., Lu, Y., Gao, C., & Wu, Q. (2009). Algae-Based Biodiesel Production and Optimization Using Sugarcane as the Feedstock. *Energy & Fuels*, 4166-4173.
- Chiu, S.-Y., Tsai, M.-T., Kao, C.-Y., Ong, S.-C., & Lin, C.-S. (2009). The air-lift photobioreactors with flow patterning for high-density cultures of microalgae and carbon dioxide removal. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 254-260.
- Christi, Y. (2007). Research review paper: Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- CIE. (Octubre de 2010). *Situación Actual de los Biocombustibles en el Ecuador*. Obtenido de Corporación para la Investigación Energética: <http://www.energia.org.ec/>
- Converti, A., Casazza, A., Ortiz, E., Perego, P., & Del Borgui, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48, 1146-1151.
- Devogswami, C., Kalita, M., Talukdar, J., Bora, R., & Sharma, P. (2011). Studies on the growth behavior of *Chlorella*, *Haematococcus* and *Scenedesmus* sp. in culture

media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas. *African Journal of Biotechnology*, 13128-13138.

Dischinger, S. (2012). *Development of Sustainable Algal Growth for Biofuel in Ecuador*. Universidad de Arizona.

Ecuavisa. (11 de Octubre de 2012). *Biocombustible será distribuido en Guayaquil desde febrero del 2013*. Obtenido de <http://www.ecuavisa.com/noticias/regionales-costa/62442-biocombustible-sera-distribuido-en-guayaquil-desde-febrero-del-2013.html>

El Telégrafo. (2012). *La gasolina Ecopaís significará un ahorro de \$9,6 millones*. Guayaquil: El Telégrafo.

Eliasson, B., Riemer, P., & Wokaun, A. (1999). *Greenhouse Gas Control Technologies*. Oxford: ELSEVIER SCIENCE Ltd.

Energías Renovables para Galápagos. ERGAL. (s.f.). *Biocombustibles*. Obtenido de <http://www.ergal.org/cms.php?c=1272>

Environmental Protection Agency. EPA. (s.f.). *Biofuels and the Environment*. Obtenido de <http://www.epa.gov/ncea/biofuels/basicinfo.htm>

Folch, J., Less, M., & Stanley, S. (1956). *A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues*. *The Journal of Biological Chemistry*.

Ge, Y., Liu, J., & Tian, G. (2011). Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO<sub>2</sub> concentration in photobioreactor. *Bioresource Technology*, 102, 130-134.

GIZ. (s.f.). *Proyecto Piloto de Generación de Electricidad Utilizando Aceite Vegetal de Piñón en las Islas Galápagos*.

González Velasco, J. (2009). *Energías Renovables*. Barcelona: Reverté.

González, A. (2000). *Alternativas en el Cultivo de Microalgas*. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Gouveia, L., & Oliveira, A. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 269-274.

Haq, H. (11 de Marzo de 2013). *Recycled cooking oil powers transatlantic flights*. Obtenido de <http://www.bbc.com/travel/blog/20130311-cooking-oil-powers-transatlantic-flights>

Havlík, P., Schneider, U., Schmid, E., Böttcher, H., Fritz, S., Skalský, R., y otros. (2010). *Global land-use implications of first and second generation biofuel targets*. *Energy Policy*.

- Held, P. (2011). *Monitoring of Algal Growth Using their Intrinsic Properties. Use of a Multi-Mode Monochromator-based Microplate Reader for Biofuel*. Winooski: BioTek Instruments.
- Herediia-Arroyo, T., Wei, W., & Hu, B. (2010). Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Springer Science+Business Media (Appl Biochem Biotechnol)*, 1978-1995.
- Hoy, E. (01 de 12 de 2011). *En 2012, el biodiésel espera ser una alternativa energética*. Obtenido de El Hoy: <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/en-2012-el-biodiesel-espera-ser-una-alternativa-energetica-518086.html>
- International Energy Agency. (2012). *Key World Energy Statistics*. París.
- Janssen, M. (2002). *Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield*. Wageningen: Ponsen & Looijen BV.
- Jeong, M., Gillis, J., & Hwang, J.-Y. (2003). Carbon Dioxide Mitigation by Microalgal Photosynthesis. *Bull.Korean Chem. Soc.*, 24(12).
- La Fabril. (s.f.). *Biodiesel*. Obtenido de [http://www.lafabril.com.ec/lafabril/industriales\\_biodiesel.php](http://www.lafabril.com.ec/lafabril/industriales_biodiesel.php)
- La Nación. (15 de Agosto de 2011). *YPF aumentó 6% sus combustibles*. Obtenido de <http://www.lanacion.com.ar/1397760-ypf-aumento-6-sus-combustibles>
- Li, Y., Chen, Y.-F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., y otros. (2011). Characterization of microalgae *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102, 5138-5144.
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett*, 31, 1043-1049.
- Lodish, H., Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, y otros. (2006). *Biología Celular y Molecular*. Bueno Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Mata, T., Martins, A., & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232.
- Mazzuca Sobczuk, T., García Camacho, F., Molina Grima, E., & Yusuf Chisti. (2006). Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 28, 243-250.
- Miao, X., & Wu, W. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgae oil. *Bioresource Technology*, 97, 841-846.

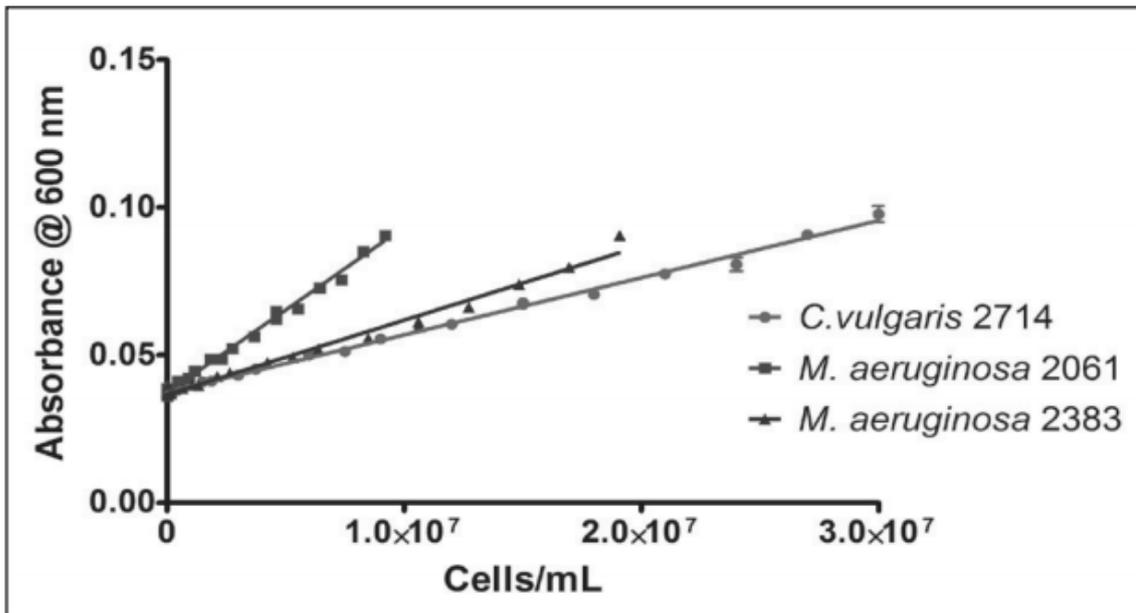
- Ministerio de Agricultura, Gandería, Acuacultura y, P., Ministerio del Ambiente, Ministerio de Electricidad y Energía Renovable, & Ministerio de Minas y Petróleo. (NA de 12 de 2007). *Biocombustibles*. Obtenido de Comunidad Andina: [http://www.comunidadandina.org/desarrollo/biocombustibles\\_ecuador.pdf](http://www.comunidadandina.org/desarrollo/biocombustibles_ecuador.pdf)
- Ministerio de Recursos Naturales No Renovables. (2011). *Ecopais*. Obtenido de <http://190.11.28.23/es/coberturas-especiales/ecopais.html>
- Molina, M., & Molina, L. (2004). Megacities and Atmospheric Pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 644-680.
- Ochoa-Herrera, V. (2010). *Foro "Biocombustibles"*. Quito: Maestría en Desarrollo Energético Sustentable. Universidad de Calgary, Universidad San Francisco de Quito.
- Parra, R. (2008). Contribution of oil palm isoprene emissions to tropospheric ozone levels in the Distrito Metropolitano del Quito (Ecuador). *Air Pollution. Sixteen International Conference on Modeling, Monitoring and Management of Air Pollution*, 95-104.
- Pedroni, P., Davison, J., Beckert, H., Bergman, P., & Benemann, J. (2001). A Proposal to Establish an International Network on Biofixation of CO<sub>2</sub> and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae. *Journal of Energy & Environmental Research*, 1, 136-150.
- Posten, C., & Schaub, G. (2009). Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels-A process view. *Journal of Biotechnology*, 142, 64-69.
- Prassone, A., Cattaneo, C., Di Termini, I., Rovatti, P., Panatto, D., & Rovatti, M. (s.f.). *Microalgae biomass production process by air-lift photobioreactors*. Génova: Universidad de Génova.
- Renewable Energy Policy Network for the 21st Century. (2012). *Renewables 2012 Global Status Report*. París.
- Renewable Energy Policy Network for the 21st Century. (s.f.). *Renewables Interactive Map*. Obtenido de <http://map.ren21.net/#fr-FR/search/by-technology/8,11,29,122>
- Renovable, M. d. (ND de ND de ND). *Subsecretaría de Energía Renovable y Eficiencia Energética*. Obtenido de Ministerio de Electricidad y Energía Renovable: [http://www.mer.gob.ec/index.php?option=com\\_content&view=article&id=300:subsecretaria-de-eficiencia-energetica-proyectos&catid=18:noticias1](http://www.mer.gob.ec/index.php?option=com_content&view=article&id=300:subsecretaria-de-eficiencia-energetica-proyectos&catid=18:noticias1)
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L., & Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101, 58-64.

- Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussnug, J., Posten, C., y otros. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Springer Science+Business Media*, 1:20-43.
- Schuchardt, U., Sercheli, R., & Vargas, R. (1997). Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *Jornal of The Brazilian Chemical Society*, Vol. 9: 199-210.
- Serrano, L. (2012). *Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad Ingeniería. Departamento Ingeniería Química y Ambiental.
- Sostaire, M., Golob, J., Bricelj, M., Klinar, D., & Pivec, A. (2009). Studies on the Growth of *Chlorella vulgaris* in Culture Media with Different Carbon Sources. *Chem.Biochem. Eng. Q*, 23(4), 471-477.
- Spoehle, H., & Milner, H. (1948). *The Chemical Composition of Chlorella; Effect of Environmental Conditions*. National Center for Biotechnology Information.
- Sueoka's high salt medium.(s.f.). Obtenido de Chlamydomonas Connection: <http://www.chlamy.org/Sueoka.html>
- Superintendencia de Industria y Comercio Colombia . (2011). *Biocombustibles. Biodiesel de Primera Generación*. Bogotá.
- Superintendencia de Industria y Comercio Colombia. (2011). *Biocombustibles. Biodiesel de Segunda y Tercera Generación*. Bogotá.
- Tanner, S. (2009). *Biofuels if th Third Generation. Do Microalgae Solve the Energy Problem?* Zürich: Department of Environmental Science, ETH Zürich.
- Tredici, M. (2004). Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. En *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (págs. 178-215). Blackwell Science.
- Ugwu, C., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology (ELSEVIER)*, 99: 4021-4028.
- United Nations. United Nations Conference on Trade and Development. (2010). *The future energy matrix and renewable energy: implications for energy and food security*. Ginebra.
- UTEX. (s.f.). *Bristol Medium*. Obtenido de UTEX Yhe Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin: <http://web.biosci.utexas.edu/utex/mediaDetail.aspx?mediaID=29>
- UTEX. (s.f.). *Proteose Medium*. Obtenido de <http://web.biosci.utexas.edu/utex/mediaDetail.aspx?mediaID=65>

- UTEX. (s.f.). *UTEX The Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin*. Obtenido de <http://web.biosci.utexas.edu/utex/algaeDetail.aspx?algaeID=2779>
- Valderrama, L., Del Campo, C., Rodriguez, C., de-Bashan, L., & Bashan, Y. (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalgae *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research*, 36, 4185-4192.
- World Energy Council. (2010). *2010 Survey of Energy Resources*. Londres: World Energy Council.
- World Energy Council. (2010). *Biofuels: Policies, Standards and Technologies*. Londres: World Energy Council.
- World Energy Council. (2011). *Global Transport Scenarios 2050*. Londres: World Energy Council.
- WWF. (2009). *Posición de WWF sobre el desarrollo de los biocombustibles*. España.
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J., & Wu, Q. (2007). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 29-36.
- Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 499-507.
- Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., & Chen, Y. (2010). Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*.
- Yeh, K.-L., Chang, J.-S., & Chen, W.-m. (2010). Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Eng. Life Sci.*, 3: 201-208.

## 8. ANEXOS

**Anexo 1.** Curvas de calibración para el crecimiento de cepas de microalgas en medio BG11 basadas en medidas de absorbancia inducidas por la dispersión de luz. Fuente: Held (Held, 2011).



**Anexo 2.** Representación del fotobiorreactor tubular a escala 1:25 diseñado por el Ph.D. Ródney Peñafiel.



Escala 1:26