



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**Procesos de Upstream y Downstream en la producción de biomasa de  
microalgas**

**Felipe Mosquera Ayora**

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

Quito, mayo 2015

**Universidad San Francisco de Quito**

**Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Procesos de Upstream y Downstream en la producción de biomasa de microalgas**

Felipe Mosquera Ayora

Daniela Almeida S., Dr-Ing.  
Directora de la tesis

---

Valeria Almeida S., M.Sc.  
Miembro del Comité de Tesis

---

Andrea C. Lándazuri , M.Sc.  
Miembro del Comité de Tesis

---

Xímena Córdova., Ph.D.  
Decano del Colegio Politécnico

---

**Quito, mayo 2015**

**© Derechos de Autor**

**Felipe Mosquera ayora**

**2015**

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: Hernán Felipe Mosquera Ayora

C. I.: 1709539413

Quito, mayo de 2015

## RESUMEN

La producción de biomasa microalgal es una importante y prometedora tecnología en cuanto al desarrollo de productos sustentables y renovables. Estos microorganismos pueden ser producidos en zonas desérticas sin comprometer suelos cultivables o recursos hídricos mayores a los usados por cultivos terrestres, incluso puede configurarse el sistema de producción para que utilice aguas residuales, así como utilizar emisiones de dióxido de carbono, como el emitido por plantas termoeléctricas u otras industrias. Este gas es fijado durante el crecimiento microalgal. En la presente investigación se estudiaron los procesos de upstream y de downstream de biomasa microalgal.

Los procesos de upstream consistieron: selección y obtención de cepas microalgales, estudio de sistemas de producción y diseño e implementación de un fotobiorreactor. Los procesos de downstream incluyeron la recuperación de la biomasa por medio de: floculación, sedimentación, centrifugación y secado.

Se cultivaron dos cepas de microalgas: *Chlorella Vulgaris* y *Arthrospira Plantensis* (conocida comúnmente como *Spirulina*). En el fotobiorreactor con airlifting de 7.5L la cepa de *Spirulina* presentó fases bien definidas de crecimiento típicas de microorganismos, como: aclimatización, crecimiento exponencial y desaceleración. En el caso de la *Chlorella* no se observó fases de crecimiento tan claramente distinguibles y el estudio de esta cepa se basó principalmente en operaciones de recuperación de su biomasa (Downstream). La biomasa de *Spirulina* se recuperó en casi el 100% con un proceso básico de separación sólido-líquido de filtración al vacío.

La biomasa de *Chlorella Vulgaris*, se recuperó mediante varias operaciones unitarias. Se recuperó en proporciones superiores al 95% con la centrifugación, sin embargo el volumen de procesamiento y el tiempo de recuperación fueron inferiores a las que se pudo obtener mediante floculación con la cual se obtuvo alrededor de 65% de recuperación.

## ABSTRACT

Microalgae biomass production represents an important and promising technology for the development of renewable and sustainable products. These microorganisms can be produced in desertic zones without compromising arable land or water resources; microalgae production systems can be configured to use waste water, and also carbon dioxide from exhaust gases, like those from thermoelectric plants or other industries. This gas is fixed during the microalgae growth. In this research, upstream and downstream processes for microalgae production were studied. Among the upstream processes, strain isolation techniques, biomass production systems, design and set up of photobioreactor, were performed. The downstream processes included: flocculation, sedimentation, Centrifugation and Drying.

Two microalgae strains were cultivated: *Chorella Vulgaris* and *Arthrospira Plantensis* (known as *Spirulina*). With the *Spirulina* strain, typical microbial growth phases such as lag phase, acceleration, exponential phase and deceleration, were observed in the 7.5L photobioreactor.

The *Chlorella Vulgaris* did not show a well defined growth pattern, and its study was principally made over the biomass recuperation processes (Downstream). The *Chlorella V.* biomass produced from the bioreactors was recovered in a 95%, using centrifugation; however the processed volume and the recovery time with this method were inferior, to those processed using flocculation-sedimentation. With the flocculation 65% of the biomass was recovered.

## TABLA DE CONTENIDO

### Tabla de contenido

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introducción</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>1.2 Justificación del Proyecto</b> .....                                 | <b>10</b> |
| <b>1.3 Objetivos</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>1.3.2 Objetivos específicos</b> .....                                    | <b>11</b> |
| <b>2. Fundamentos teóricos</b> .....  | <b>12</b> |
| <b>2.1. Biología básica y clasificación de microalgas</b> .....             | <b>12</b> |
| 2.1.1. Conceptos biológicos básicos .....                                   | 12        |
| 2.1.2. Clasificación de las microalgas .....                                | 13        |
| <b>2.2. Aplicaciones industriales de microalgas</b> .....                   | <b>14</b> |
| 2.2.1. Producción de biocombustibles .....                                  | 14        |
| 2.2.2. Productos químicos de interés y otras aplicaciones.....              | 16        |
| <b>2.3. Producción de biomasa microalgal</b> .....                          | <b>17</b> |
| 2.3.1. Medios de Cultivo .....  | 17        |
| 2.3.2 Identificación, separación y purificación de cepas microalgales ..... | 18        |
| 2.3.3. Producción y cultivo de biomasa microalgal.....                      | 18        |
| 2.3.4. Fotobiorreactores con Airlifting .....                               | 21        |
| <b>2.4. Procesos de recuperación de biomasa (Downstream)</b> .....          | <b>23</b> |
| <b>2.5. Cinética de crecimiento y conteo celular</b> .....                  | <b>25</b> |
| <b>3. MÉTODOS EXPERIMENTALES</b> .....                                      | <b>29</b> |
| <b>3.1. Identificación y separación de microalgas</b> .....                 | <b>29</b> |
| <b>3.2. Escalamiento de las cepas microalgales</b> .....                    | <b>32</b> |
| <b>3.3 Conteo celular y cinética de crecimiento</b> .....                   | <b>33</b> |
| 3.3.1. Conteo celular con microscopio retroiluminado .....                  | 33        |
| 3.3.2 Determinación concentración celular por densidad óptica.....          | 34        |
| <b>3.4 Diseño y operación de Fotobiorreactor con Airlifting</b> .....       | <b>35</b> |
| <b>3.5 Recuperación de la biomasa</b> .....                                 | <b>38</b> |
| 3.5.1. Filtración.....  | 39        |
| 3.5.2 Centrifugación .....  | 39        |
| 3.5.3 Floculación del biocoloide de Chlorella Vulgaris .....                | 40        |
| <b>4.RESULTADOS</b> .....   | <b>42</b> |
| <b>4.1 Resultados obtenidos de los procesos de upstream</b> .....           | <b>42</b> |
| <b>4.2 Operación del Fotobioreactor</b> .....                               | <b>46</b> |
| <b>4.3 Resultados Procesos Downstream</b> .....                             | <b>49</b> |
| <b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....                              | <b>54</b> |
| <b>6. Referencias</b> .....   | <b>56</b> |

## 1. INTRODUCCIÓN

La importancia de las microalgas radica en el mismo origen de la vida en el planeta, siendo estos uno de los primeros microorganismos en la faz de La Tierra y uno de los principales contribuyentes del oxígeno en la formación de la atmósfera [1].

En la actualidad, sus aplicaciones industriales radican en la producción de suplementos alimenticios, tratamiento de aguas residuales, fijación de dióxido de carbono, materia prima para la obtención de productos energéticos, biotecnológicos y químicos [2].

Actualmente el campo más exigente, del estudio de aplicaciones de microalgas, es en el sector energético, debido a la enorme demanda y consumo de energía que tan solo en 1997 fue de alrededor de 450 Quads (donde un quad, equivale a  $10^{15}$  de BTUs) o 474.8 exajoules en aquel año a escala mundial [3].

### 1.1 Antecedentes

La producción de microalgas está marcada por el trabajo pionero del científico alemán Otto Heinrich Warburg alrededor de 1919, principalmente con el fin de utilizar estos microorganismos para investigación bioquímica y mejorar el conocimiento respecto a la fotosíntesis [1]. Posteriormente el interés en el cultivo de microalgas se dió con fines de producción de fitoplancton para la acuicultura y la alimentación humana. En el Instituto Carnegie en Washington, en la década de 1950, un grupo de investigadores empezó a utilizar la producción de microalgas para abatimiento de CO<sub>2</sub> emanado de instalaciones industriales [2].

Uno de los más sobresalientes programas de producción de microalgas es el *Aquatic Species Program-Biodiesel From Microalgae* del National Renewable Energy Laboratory

del Departamento de Energía de los Estados Unidos [4]. Este programa tuvo como propósito la obtención de combustibles para transporte obtenido a partir de la biomasa de microalgas. El programa realizó amplios estudios tanto a nivel de laboratorio como de sistemas de producción. A nivel de laboratorio se desarrolló un amplio trabajo de selección, colección y caracterización de especies de microalgas que se ajusten a los fines del programa. Al no encontrarse una única especie óptima, el proyecto se enfocó al estudio de la bioquímica implicada en la producción de lípidos por estos microorganismos, que es el componente principal cuando el interés es la producción de biodiesel. A nivel de sistemas de producción se realizaron importantes combinaciones de producción de biomasa con tratamiento de aguas, y abatimiento de dióxido de carbono emitido de plantas termoeléctricas. El programa operó de 1978 hasta 1996 que fue suspendido por cortes de presupuesto [4].

Algenol-Biodiesel anunció en 2006, un proyecto de \$ 850 millones USD para la producción de etanol mediante microalgas. Los productores de biodiesel Sapphire Energy y Solasyme han logrado levantar fondos por cerca de \$ 200 millones USD de capitales de riesgo de inversión para biocombustible a partir de algas. Uno de los actores más interesantes que ha entrado en este campo, es ExxonMobil, el mayor productor de combustibles y segunda empresa más grande del planeta, anunció en 2009 un proyecto de \$ 600 millones USD para obtener biocombustibles mediante microalgas, de los cuales \$ 300 millones USD destinaría a Synthetic Genomics Inc. (SGI) fundada por Craig Venter [5].

El proyecto de biocombustibles a partir de algas de ExxonMobil, destinó hasta 2013 \$ 100 millones USD a SGI, el proyecto hasta la fecha no logró obtener combustibles económicamente viables y capaces de competir con los actuales combustibles de origen

fósil, por lo que el proyecto se reenfocherà a la ciencia básica, como biología molecular, antes que al escalamiento de la producción [6] SGI ha anunciado que ya ha logrado la reingeniería de microalgas a que estas directamente secreten los hidrocarburos similares a combustibles actuales, en lugar del proceso tradicional de producción de biomasa, extracción de lípidos y posterior refinación, a que recién ahí puedan usarse como combustibles [5].

## **1.2 Justificación del Proyecto**

Motivos como el Cambio Climático y la naturaleza no renovable y finita de los combustibles fósiles hacen imperante la búsqueda de otras fuentes energéticas, de carácter renovable y con menores impactos ambientales. En este sentido, las microalgas han generado especial interés. Sin embargo esta no es la única aplicación industrial para el cultivo microalgas. Existen otros usos como son la acuicultura, la nutrición humana, tratamiento de agua residuales y abatimiento de dióxido de carbono. Aunque en su aplicación energética, aún no se han obtenido los resultados requeridos para su viabilidad como sustituto de combustibles fósiles. La producción de biomasa microalgal en sistemas combinados, es decir sistemas que por ejemplo, sirvan tanto para producir la biomasa para ser usada en productos energéticos y también tratar aguas residuales, o que se use combinadamente para abatir emisiones de CO<sub>2</sub> y producir biomasa con fines de acuicultura o nutricionales, resulta prometedora y con mayor perspectiva de éxito.

Considerando estos potenciales, resulta necesario explorar e identificar los procesos de Upstream y Downstream de los Sistemas de Producción de Biomasa Microalgal, ya que se podrían identificar operaciones unitarias en la que se puede optimizar la producción desde la perspectiva de la Ingeniería Química y De Procesos, como son el diseño de

biorreactores, la selección y comparación de procesos para la recuperación de la biomasa; y sumarse al desarrollo que desde la Bioquímica y otras ciencias básicas en las cuales se realizan investigaciones para hacer viables las potenciales aplicaciones de la biomasa microalgal.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivos generales**

Identificar y llevar a cabo las operaciones unitarias y los procesos desarrollados en la producción y recuperación de biomasa microalgal para conocer experimentalmente los requisitos y las dificultades que estos exigen.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

Realizar de manera experimental los procesos de Upstream necesarios para la producción de Biomasa Microalgal:

- Identificación y separación de cepas microalgales
- Obtención de uno o más inóculos y escalamiento
- Diseño y operación de un fotobiorreactor con airlifting.
- Determinación de cinética de crecimiento celular de la *Spirulina plantensis* en el fotobiorreactor.

Conocer experimentalmente los procesos de Downstream para la recuperación de la biomasa producida:

- Recuperación primaria: sedimentación por gravedad, floculación, filtración
- Microfiltración y Centrifugación
- Secado y deshidratación.
- Determinación de porcentajes de recuperación con cada proceso

## 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

La producción y el estudio de microalgas se ha realizado por más de un siglo [1]. Sin embargo, muchas aplicaciones y avances han ido y continúan apareciendo a lo largo del tiempo, por lo que es importante para el seguimiento de la investigación en esta área, no solo revisar los conceptos ya definidos en los libros, sino en publicaciones periódicas académicas que van dando cuenta de la evolución y desarrollo de este tema de estudio.

### 2.1. Biología básica y clasificación de microalgas

Las microalgas son la versión microscópica de las plantas primitivas talofitas que contienen *clorofila a* [7]. Estos microorganismos pertenecen al dominio de las Eucariotas, a excepción de la Cianobacterias, que están clasificadas como microalgas por ser bacterias fotosintéticas, pero son Procariotas[8].

#### 2.1.1. Conceptos biológicos básicos

El dominio de los Eucariotas, es el de los organismos cuyas células tienen organelos contenidos dentro de una membrana definida, es decir que contienen un núcleo a diferencia de los organismos Procariotas [7].

Las microalgas pueden ser tanto autotróficas como heterotróficas. El primer tipo implica que para su crecimiento solo requieren compuestos inorgánicos (como el dióxido de carbono), luz y ciertas sales para generar biomasa, su fuente de energía celular es obtenida mediante fotosíntesis; a diferencia las heterotróficas no son fotosintéticas y necesitan una

fuente externa de compuestos orgánicos. Existen también microalgas mixotróficas, que pueden crecer ya sea de forma autotrófica como heterotróficamente [8].

La mayor parte de las microalgas son autotróficas. Pero mediante ingeniería genética, varias especies han sido transformadas a heterotróficas, para facilitar tener cualquier opción para su método de producción cuando se realiza el escalamiento [1].

### **2.1.2. Clasificación de las microalgas**

En términos de abundancia relativa se pueden definir cuatro grupos o clases principales de microalgas, que principalmente se diferencian entre sí por su pigmentación y composición bioquímica [4]:

- **Diatomeas:** Dominan el fitoplancton de los océanos, pero también pueden ser encontradas en agua dulce y salobre (0.5-35 g sales/ L). Se estima que existen cerca de 100 mil especies dentro de este grupo, sus células presentan un color dorado-pardo, Las diatomeas almacenan biomasa en forma de lípidos y sus paredes celulares contienen Silicio polimerizado, por lo que para su crecimiento se requiere de silicatos que pueden encarecer el escalamiento de sistemas de producción [7].
- **Chlorophyceae (Algas verdes):** Se estima que existen alrededor de 8 000 especies en este grupo. Se caracterizan por tener clorofila *a* y clorofila *b*. Almacenan biomasa en forma de almidón, pero en ciertas condiciones también almacenan lípidos en sus células [7].

- Chrysophyceae (algas doradas): Existen aproximadamente 1 000 especies en este grupo y se encuentran principalmente en agua dulce. Son similares a las diatomeas en composición y bioquímica. Producen aceites y carbohidratos como compuestos de almacenamiento [8].
- Cianobacterias: Son las únicas microalgas procariotas por lo que son ampliamente diferentes con los demás grupos. Ocurren en diversos hábitats y existen cerca de 2 000 especies en esta categoría. Son responsables de fijar el Nitrógeno atmosférico y no almacenan lípidos en cantidades significativas en sus células [8].

## **2.2. Aplicaciones industriales de microalgas**

La producción de microalga, tiene aplicaciones industriales como: producción de biocombustibles, alimentación humana, alimento para acuicultura, productos químicos, abatimiento de CO<sub>2</sub> de emisión industrial, tratamiento de aguas residuales. Los sistemas integrados que combinan dos o más de los anteriores.

### **2.2.1. Producción de biocombustibles**

En términos de producción de biocombustibles, los componentes de interés de las microalgas son los lípidos. Para este fin se han determinado varias especies viables, así como técnicas para incrementar la producción de lípidos, una de estas técnicas es privar o limitar a cantidades insuficientes de nitrógeno a las células, lo que produce una mayor concentración de lípidos en cada célula. Pero este incremento en lípidos se ve contrarrestado por la disminución de la producción numérica de células. Es decir se reduce la tasa de generación nuevas células aunque estas tengan más concentración de lípidos [4].

Los lípidos de interés para los biocombustibles son los triglicéridos, que consisten en tres cadenas largas de ácidos grasos unidos a una cadena principal de glicerol. Los triglicéridos no pueden ser usados directamente en motores actuales por lo que deben primero ser transesterificados con alcoholes simples, como se muestra en la Figura 2.1, para obtener alquil ésteres, que es el biodiesel [8].

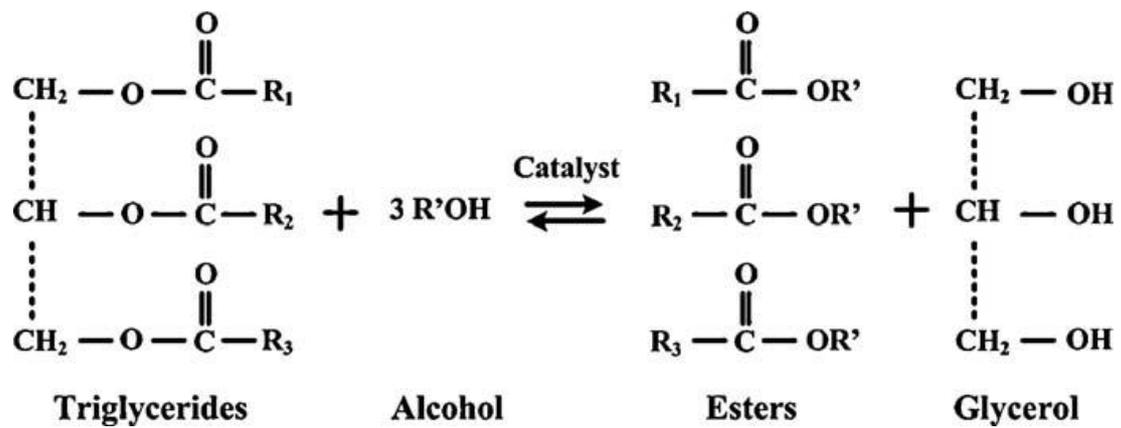


Figura 2.1: Transesterificación de triglicéridos [9]

### 2.2.2. Productos químicos de interés y otras aplicaciones

De varias cepas de microalgas se pueden obtener valiosos productos químicos con distintas aplicaciones, las cuales se indican en la Tabla 2.1

Tabla 2.1: Productos obtenidos de microalgas y su Mercado [10]

| Productos                         | Aplicación       | Valor (USD/kg) | Mercado (millones USD) |
|-----------------------------------|------------------|----------------|------------------------|
| <b>Ficobiliproteínas</b>          | Investigación    | 10 000         | 1-10                   |
|                                   | Colorante comida | 100            |                        |
| <b>Beta-Caroteno</b>              | Provitamina A    | 500            | 1-10                   |
|                                   | Colorante comida | 300            |                        |
| <b>Xantófilos</b>                 | Alimento         | 200-500        | 10-100                 |
| <b>Vitamina C</b>                 | Nutriente        | 10             | 10-100                 |
| <b>Vitamina E</b>                 | Nutriente        | 50             | 10-100                 |
| <b>Polisacáridos</b>              | Viscosificantes  | 5-10           | 10-1000                |
| <b>Aminoácidos:</b>               |                  |                |                        |
| <b>Prolina</b>                    | Nutrientes       | 5-50           | 1-10                   |
| <b>Arginina</b>                   | Nutrientes       | 50-100         | 1-10                   |
| <b>Ácido Aspártico</b>            | Gomas            | 2-5            | 100-1000               |
| <b>Proteínas de célula simple</b> | Alimento animal  | 10-20          | 100-2000               |

### **2.3. Producción de biomasa microalgal**

Las microalgas ocurren en una amplia diversidad de ambientes y condiciones, y existe una inmensa variedad de especies estimada en el orden de las decenas de miles [1] por lo que para su producción es importante conocer sus características taxonómicas, métodos y medios de cultivo específicos para el crecimiento óptimo de cada cepa. Además se debe conocer las características de las microalgas ya que tienen un impacto en el uso que se vaya a dar de estas [8].

#### **2.3.1. Medios de Cultivo**

De acuerdo a los medios de cultivo en donde crecen las microalgas, se pueden establecer dos grupos principales de microalgas: las de agua dulce y las de agua salina. Los medios de cultivo son preparados en concordancia con las condiciones de ocurrencia natural del microorganismo, y es enriquecido con los nutrientes presentes en el medio natural. Para varias cepas se han establecido recetas de medios de cultivo específicas, para dar un pH, salinidad, concentración de macro y micronutrientes óptimos [4].

Además de los medios de cultivo en solución acuosa, los medios de cultivo pueden solidificarse usando agar. El agar es una sustancia formada por agarosa y agarpectina, su textura es gelatinosa y tiende a solidificarse, sirve principalmente para separación y purificación de las microalgas, o para mantener inóculos, más no para escalar la producción. Estos medios de cultivo tienen tres componentes principales: macronutrientes, elementos traza y vitaminas [1].

### **2.3.2 Identificación, separación y purificación de cepas microalgales**

Para la separación de cepas de microalgas de interés de su fuente de ocurrencia natural, donde se encuentran en conjunto con otros microorganismos e impurezas, es importante reconocer la taxonomía de estas, tanto para reconocer y poder identificar las cepas, como para saber sus condiciones de cultivo. Una vez se ha identificado, se realizan recolecciones de muestras, usando técnicas estériles, como son el uso de contenedores y materiales que se usen para la colección de la muestra, que hayan sido esterilizados. El microorganismo de interés se puede aislar de la muestra, eliminando contaminantes mediante técnicas como: dilución, aislamiento de células únicas mediante micropipetas y estriado en agar. Una vez con estas células aisladas se puede proseguir a subcultivos en medio fresco, en estas transferencias se puede presentar un decaimiento en el crecimiento o muerte de la microalga, que se puede dar debido a la carencia de algún elemento o compuesto que requiera el microorganismo, o debido a contaminación por acumulación de tóxicos de metabolitos provenientes del propio organismo [1].

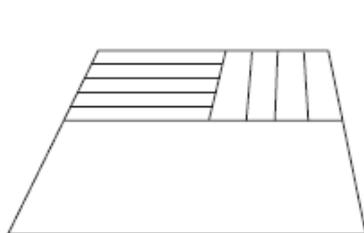
### **2.3.3. Producción y cultivo de biomasa microalgal**

Los sistemas de producción se pueden clasificar por varios parámetros, principalmente si son sistemas continuos o por lotes; o sistemas abiertos o cerrados.

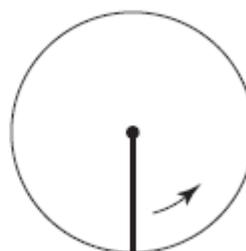
En los cultivos continuos se añade una carga fresca permanente de medio, a la misma velocidad que es retirado el volumen equivalente del sistema, permitiendo así mantener en crecimiento exponencial indefinidamente. La densidad celular en este tipo de cultivo es fija.

En los cultivos por lotes este el volumen se mantiene fijo por un tiempo determinado hasta que se requiera recuperar la biomasa. En este tipo la densidad celular es variable.

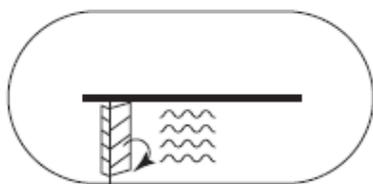
Existen diferentes tipos de sistemas abiertos de cultivo para microalgas, algunos de estos se pueden observar en la Figura 2.2. Estos cultivos son una de las formas más simples de producción, ya que básicamente consisten en un tipo de piscina de poca profundidad, de entre 12-15 cm para optimizar el uso de la luz en la fotosíntesis. Debido a esta poca profundidad demandan extensas superficies para su operación. Dentro de estos sistemas el más utilizado son los estanques con rotor de paletas (Figura 2.2 c). Este tipo de estanque presenta agitación mediante uno o 2 rotores y existen de tamaño comercial de entre 1000 a 5000 m<sup>2</sup> [10].



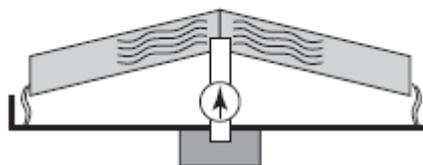
(a) Estanque sin Agitación



(b) Piscina circular con Agitación



(c) Estanque con rotor de paletas

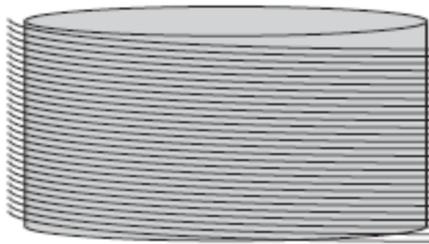


(d) Cascada con gradiente

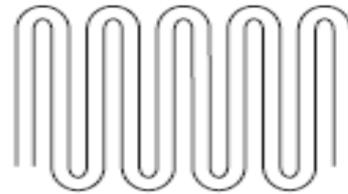
Figura 2.2: Sistemas de cultivo abierto. [10]

Los sistemas de cultivo cerrado presentan varias ventajas respecto a los sistemas abiertos, como son mayor facilidad de mantener libre de contaminación a las algas en producción, reducción de las pérdidas de agua por evaporación que pueden causar efecto desfavorable aumento la salinidad, obtención mayores concentraciones celulares y recuperación más fácil de la biomasa, existen varios tipos de este sistema como: bolsa de cultivo, paneles alveolares, tanque de agitación, reactores tubulares y reactores con airlifting.

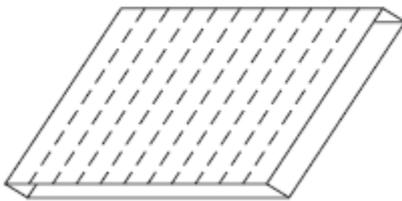
En la figura 2.3 se representan gráficamente algunos ejemplos de estos sistemas de producción cerrados.



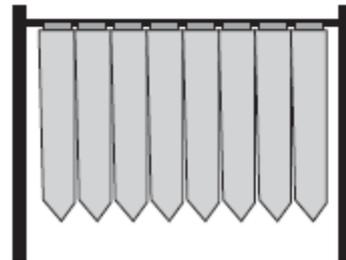
(a) Tubular helicoidal



(b) Tubular plano



(c) Paneles Laminares



(d) Mangas Colgantes

Figura 2.3: Sistemas cultivo cerrado [10]

### **2.3.4. Fotobiorreactores con Airlifting**

Los fotobiorreactores son estructuras de volúmenes determinados, total o semi-cerradas, utilizadas para la producción fototrófica de microorganismos que utilizan energía lumínica, la cual suele generarse mediante iluminación eléctrica. Una manera de obtener mezclado y agitación en estos fotobiorreactores es produciendo un flujo ascendente de aire llamado airlifting. Esto se logra causando diferencias de densidad en el fluido líquido debido a la inyección de un fluido gaseoso en el fotobiorreactor [1]. El sistema de agitación por airlifting, se utiliza debido a que las microalgas son sensibles a las fuerzas hidrodinámicas que genera la agitación mecánica y que puede dañar a estas células [10].

Los sistemas cerrados o semi-cerrados, están más protegidos del ambiente y contaminantes, y es más fácil tener el sistema bajo control, por lo que se obtienen mayores densidades celulares, que en los sistemas abiertos. Sin embargo también presentan desventajas como acumulación de oxígeno disuelto debido a la fotosíntesis que se lleva a cabo y que no puede ser emanada a la atmósfera como en los sistemas abiertos.

Otra consideración es la eficiencia lumínica, ya que estos sistemas tienen menor proporción superficie-volumen, es decir hay menos superficie expuesta a la fuente lumínica. Por lo que se da un efecto de sombra entre las células, limitando los fotones que recibe cada una. Estas desventajas pueden mitigarse con el sistema airlifting que ayuda a expulsar el oxígeno y con el movimiento que genera, se expone más células, más tiempo a la luz.

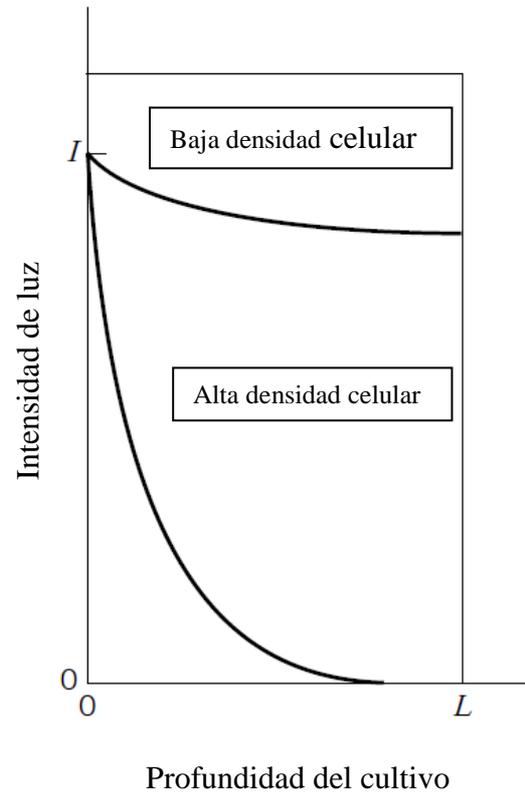


Figura 2.4: Decaimiento de intensidad de luz, desde la superficie iluminada [10]

En la Figura 2.4 se puede observar una curva superior con baja concentración celular, donde la intensidad lumínica casi no decae a medida que incrementa la profundidad del cultivo, y la curva inferior de alta densidad celular donde decae exponencialmente la intensidad luminosa con la profundidad del cultivo opuesto al lado donde se encuentra la fuente lumínica [10].

El sistema de Airlifting, consiste en una agitación neumática, generada por aire u otros gases, que producen una circulación definida. En los reactores Airlifting, se tienen dos canales, uno de ingreso del gas, en el cual la fase líquida asciende y un canal de descenso; estos canales se conectan al inicio y al final. Existen dos configuraciones de estos reactores:

- Circuito externo: la circulación se da por conductos separados.
- Circuito interno o con deflectores: existe una estructura interna del reactor que define los patrones de flujo dentro de estos.

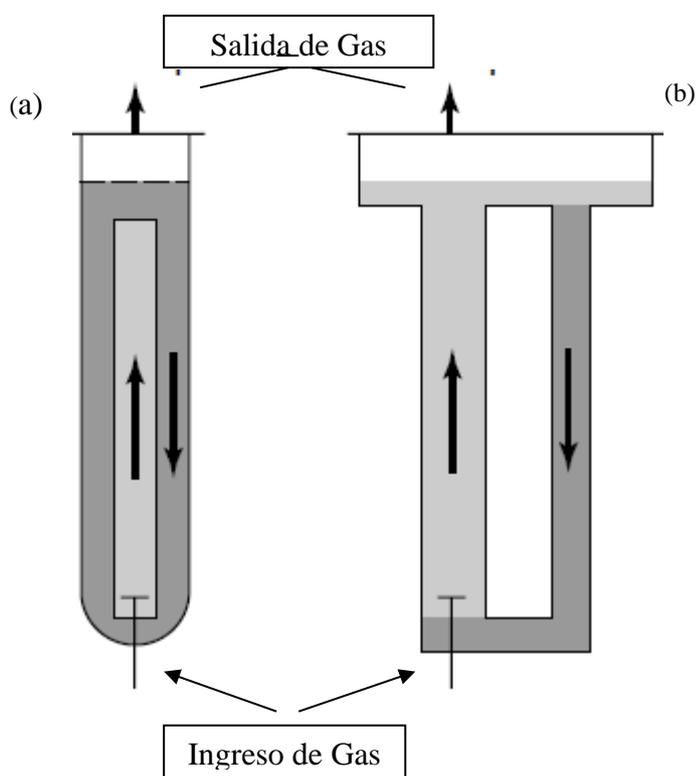


Figura 2.5: Reactores Airlifting: (a) circuito interno; (b) circuito externo [10]

#### 2.4. Procesos de recuperación de biomasa (Downstream)

Para la recuperación de la biomasa de las microalgas, ya que a diferencia de los cultivos terrestres convencionales, donde el producto de interés generalmente se obtiene con la cosecha, en el caso de las microalgas se requieren procesos intensivos para recuperar la biomasa, que se encuentra en concentraciones relativamente bajas, por lo cual se requiere, concentrarlas y separarlas del medio acuoso de producción, generalmente con más de un proceso [9].

Los procesos de Downstream para la recuperación de biomasa microalgal, son de uno o más operaciones de separación sólido-líquido, debido a que las células microalgales pueden ser tan pequeñas como solo varios micrómetros de diámetro y los volúmenes de producción tener concentraciones inferiores a 0.5 kg de biomasa seca  $m^{-3}$ . Los procesos de recuperación de las microalgas son demandantes y pueden llegar a representar el 30% del costo de la obtención de biomasa microalgal [11].

Entre las operaciones para la recuperación de biomasa están:

- Sedimentación
- Floculación
- Filtración
- Centrifugación

La sedimentación por gravedad es un proceso simple de recuperación de biomasa, pero solo es factible para microalgas de mayor tamaño, como la Spirulina que supera los 70  $\mu m$  de diámetro. Sin embargo se puede usar floculación complementariamente para aumentar el tamaño de los agregados y facilitar su precipitación u otros procesos de recuperación. Las células microalgales presentan una carga negativa que impide se agreguen entre sí. El propósito de la floculación es neutralizar estas cargas para facilitar la agregación entre células, los floculantes pueden ser cationes multivalentes o polímeros catiónicos. Los floculantes usados pueden ser sales o polímeros metálicos, como por ejemplo sulfato férrico o sulfato poliférrico; generalmente los metales polimerizados tienden a ser más eficientes que las sales metálicas [11].

Los procesos de filtración convencionales son más factibles también para microalgas de diámetros mayores que superen los 70  $\mu m$ . Esta se puede realizar al vacío o a presión, y consiste en hacer pasar la mezcla sólido-líquido por un agente de retención de la fase sólida. Para microalgas de diámetros inferiores comparables a los de las bacterias ( $< 30 \mu m$ ) se requiere usar técnicas de microfiltración y de ultrafiltración, ambas son formas de filtración por membrana [8].

La centrifugación es una operación rápida y eficiente de recuperación de biomasa, pero de alta demanda energética. Por este motivo es preferiblemente utilizada cuando el producto a obtenerse de la biomasa es de alto valor y la inversión se justifica [11].

## **2.5. Cinética de crecimiento y conteo celular**

El crecimiento de los microorganismos en un medio apropiado de cultivo y por lotes sigue seis fases principales que se pueden observar en la Figura 2.6. Estas fases son:

- I. Fase de Aclimatización: en esta fase el inóculo empieza a adaptarse a las condiciones de cultivo
- II. Fase de aceleración: en esta fase las células ya están adaptadas y su velocidad de crecimiento va incrementándose hasta mostrar una velocidad exponencial
- III. Fase exponencial: en esta fase la concentración celular incrementa de manera exponencial siguiendo una modelo al expresado en la Ecuación 2.2
- IV. Fase de desaceleración: la velocidad de crecimiento empieza a reducirse y decaer.
- V. Fase estacionaria: no existe una variación neta en la concentración celular y la velocidad de crecimiento es cero en esta fase.
- VI. Fase declinamiento o muerte: la concentración celular se reduce en esta fase y la velocidad es negativa.

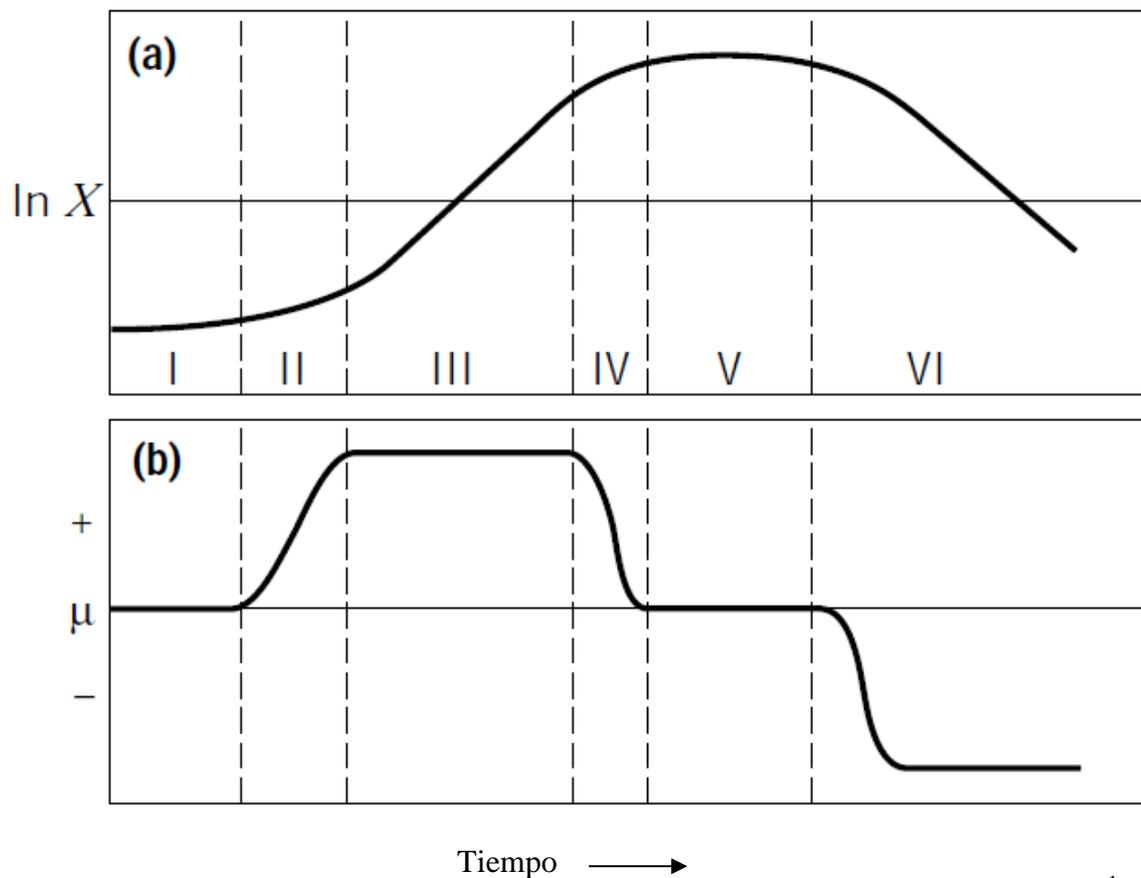


Figura 2.6: Fases de crecimiento de microorganismos. (a) Concentración celular  $X$  [ $\text{gL}^{-1}$ ] en función del tiempo. (b) Velocidad de crecimiento [ $\text{h}^{-1}$ ] en función del tiempo [10].

Durante el crecimiento exponencial de los microorganismos, la tasa de replicación de estos respecto al tiempo es proporcional a la cantidad de células presentes a cualquier momento, siguiendo la siguiente ecuación [1]:

$$r = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt}$$

Ecuación 2.1

La solución de esta ecuación tras respectiva integración es:

$$N_t = N_o e^{rt}$$

Ecuación 2.2

Donde:

|         |  |                  |
|---------|--|------------------|
| $N$ :   | Tamaño de la población (Concentración de células).       | $\frac{cel}{mL}$ |
| $N_t$ : | Tamaño de la población al final del intervalo de tiempo. | $\frac{cel}{mL}$ |
| $N_o$ : | Tamaño de la población cuando $t=0$ .                    | $\frac{cel}{mL}$ |
| $r$ :   | Velocidad intrínseca de crecimiento.                     | $t^{-1}$         |

La Ecuación 2.1 y 2.2 también puede ser expresada en términos de la concentración de biomasa celular  $X$  [ $gL^{-1}$ ], en cuyo caso serían:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

Ecuación 2.3

$$X_t = X_o e^{\mu t}$$

Ecuación 2.4

Donde:

$X$  : Concentración de masa celular [ $gL^{-1}$ ]

$X_t$  : Concentración de masa celular al final del intervalo de  $t$  [ $gL^{-1}$ ]

$X_0$  : Concentración de masa celular al inicio del intervalo [gL<sup>-1</sup>]

$\mu$  : Velocidad intrínseca de crecimiento. [h<sup>-1</sup>]

### 3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

Para el aprovechamiento de la producción de biomasa microalgal, se requiere de varios métodos para desarrollar las diferentes operaciones de upstream y de downstream. Lo primordial es contar con un inóculo viable para tener una producción de biomasa que pueda irse escalando progresivamente. Existen opciones para obtener estas cepas de colecciones de diferentes instituciones. Pero la amplia diversidad y ocurrencia de las microalgas hace importante conocer los métodos para identificar y obtener cepas presentes en el entorno. Es también central conocer el diseño y la puesta en marcha del biorreactor que se utilizará en el presente estudio.

#### 3.1. Identificación y separación de microalgas

Aunque existe la factibilidad de obtener cepas o inóculos de colecciones ya existentes de otros laboratorios fuera o dentro del país, y de hecho se pudieron obtener dos inóculos microalgales de *Chlorella Vulgaris* y *Spirulina Plantensis*, se estudiaron los métodos experimentales disponibles para el aislamiento de cepas que se puedan encontrar en cuerpos de agua locales. En el presente estudio, se tomaron muestras de la laguna de la Universidad San Francisco de Quito.

La recolección de muestras se realizó tomando en cuenta la esterilidad de los contenedores para la recolección de las muestras. Las muestras se tomaron del agua superficial hasta máximo 10 cm de profundidad, ya que al ser organismos fotosintéticos se encuentran en zonas de más exposición solar, estas se tomaron con jeringuillas estériles. También se tomaron muestras de piedras presentes y con exposición solar, estas se tomaron haciendo un leve raspado a la superficie de la piedra y colectando el material en cajas Petri. Las muestras colectadas fueron luego rápidamente preparadas para ser observadas al microscopio óptico, colocándolas en placas y agregando entre 2-4 gotas de formaldehído y luego se colocó el cubreobjetos. Las muestras fueron observadas y fotografiadas bajo el microscopio.

La identificación se realiza comparando las imágenes obtenidas de la observación bajo el microscopio de las muestras con claves de identificación de colecciones previamente

clasificadas, esto se realizó con la colaboración de los investigadores del Laboratorio de Ecología Acuática de la USFQ.

Para la separación de las microalgas observadas se consideraron dos métodos de separación de microalgas de los demás organismos e impurezas presentes en las muestras donde se tomaron:

- **Separación por micropipetas**

Este método de separación consiste en observar al microscopio una muestra del volumen de una gota (entre 5 y 10 microlitros), y absorber con una micropipeta por efecto de capilaridad a la célula objetivo, la célula capturada se deposita en una nueva gota de medio de cultivo estéril y limpia, debido a que en el primer paso se puede haber absorbido y luego depositado en la gota de medio otros microorganismos diferentes al de interés se repite el proceso hasta observar que la célula objetivo está suficientemente libre de otros microorganismos. Las células aisladas se colocan en vasos Erlenmeyer con medio de cultivo, los vasos son dispuestos en una incubadora a una temperatura estable de 21 °C [1].

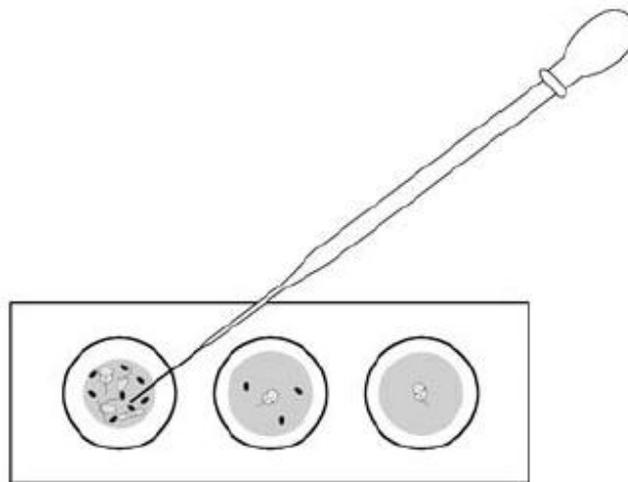


Figura 3.1: Separación mediante micropipetas [1]



Figura 3.2: Inoculación en Incubadora de microalgas aisladas con micropipeta

- **Separación mediante estriamiento en agar**

También se consideró el método de aislamiento mediante estriaciones en medio solidificado, para este caso se utilizó medio de cultivo BG-11, a dicho medio acuoso se le agregó agar al 1% para solidificar el medio y disponerlo en cajas Petri, mediante el uso de una asa metálica o un hisopo se tomaron muestras que contenían las cepas de interés y se estrió en la superficie del medio solidificado, se dispuso bajo iluminación y a temperatura de 21 grados centígrados las cajas fueron inoculadas por alrededor de una semana, luego de esto se observó el crecimiento de colonias en las cajas, las colonias se subcultivaron y estriaron en nuevas cajas Petri [1].

### 3.2. Escalamiento de las cepas microalgales

Debido a que no se logró el aislamiento y mantenimiento axénico de las cepas que se identificaron en la USFQ, debido a la persistencia de microorganismos, se procedió al escalamiento de cepas de *Chlorella Vulgaris*, y de *Spirulina Plantensis* obtenidas gracias a investigadores de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador que trabajan con estos microorganismos y que colaboran con el Laboratorio de Especies Acuáticas de la USFQ.

Para el escalamiento de los inóculos de ambas cepas, se utilizó métodos y técnicas de esterilización para evitar la contaminación de estas. El método estéril se aplicó en la manipulación de contenedores, recipientes y demás material que tuvo contacto con los microorganismos, también se mantuvo la esterilidad en la preparación de los medios de cultivo y estos en sí fueron autoclavados antes de ser utilizados.

El autoclavado se utilizó para esterilizar contenedores, Erlenmeyers y demás recipientes donde se realizó inoculaciones, también se esterilizaron las mangueras para burbujear aire en los recipientes con el inóculo; las soluciones de medio de cultivo a utilizarse también fueron autoclavadas. Este proceso de esterilización se realizó a aproximadamente 120 °C y 2 atm de presión de vapor de agua por aproximadamente una hora.

En cuanto a la manipulación de las cepas y el cultivo de estas se realizó dentro de cámaras de flujo laminar, las cuales se desinfectan con alcohol etílico al 70% y papel toalla para esparcir, utilizando guantes esterilizados de látex. Las cámaras de flujo laminar producen una cortina de aire estéril que evita la contaminación de partículas desplazadas por corrientes de aire externas a esta.

Se inocularon las cepas en Erlenmeyers de 250, 500 y 1000 mL, la especie *Chlorella Vulgaris* fue cultivada en medio de cultivo Bold's Bassal Medium (BBM) sin control de temperatura ni calentamiento externo, y con aeración provista por una bomba para pecera. La cepa de *Spirulina Plantensis* fue cultivada en las mismas condiciones pero en el medio apropiada para esta, tal como está descrito en la bibliografía y que se llama *Spirulina Medium Modified (SSM)* [1].

### **3.3 Conteo celular y cinética de crecimiento**

La determinación de la concentración y su variación respecto al tiempo, se realizó por método directo e indirecto. El primero se refiere al conteo directo bajo el microscopio mediante un método definido, el segundo se realiza una curva de calibración que relaciona la Densidad Óptica con la concentración celular y que permite luego simplemente medir la absorbancia para conocer la concentración celular de futuras muestras sin ya necesitar realizar el conteo bajo el microscopio, que es un proceso que demanda mayor tiempo y recursos.

#### **3.3.1. Conteo celular con microscopio retroiluminado**

El conteo celular se realizó con microscopios Olympus IX-70 con retroiluminación, se utilizaron cámaras de acuerdo a la especie a observarse, debido a las diferencias en sus tamaños, para el caso de la *Spirulina plantensis* se utilizó cámaras Fuchs-Rosenthal y para *Chlorella Vulgaris*, Petroff-Hauser, que es usada para microorganismos en rangos de tamaño similares a los de las bacterias, que es de entre 1 y 5  $\mu\text{m}$  [1].

Para el conteo celular de *Spirulina Plantensis* se utilizó cámaras Fuchs-Rosenthal (Blaubrand W-Germany) que son placas con 0.2 mm de profundidad y con cuadrados de 1mm de lado, se tomó muestras de cultivo con micropipetas y se agregaron a las cámaras hasta llenarlas y fueron cubiertas con placas para observación bajo microscopio, cuando existió demasiada concentración celular que dificultaba el conteo, se realizaron diluciones de entre 1:10 a 1:100 dependiendo la concentración para facilitar el conteo. Se contaron cuantas células se observaban en 5 recuadros de la cámara y se obtuvo el promedio. Conociendo que cada recuadro es de  $1\text{mm}^2$  y de 0.2mm de profundidad se determinó el número de células por volumen.

En cuanto al conteo de *Chlorella Vulgaris* cuyo diámetro es menor a  $10\mu\text{m}$  se utilizó un método similar pero con una cámara diferente usada para el conteo de microorganismos, se uso la cámara Petroff-Hausser (Hausser Scientific Co.) Esta cámara tiene 0.02mm de

profundidad e igualmente recuadros de 1mm. Esta cámara permite ser utilizada con lentes de inmersión.

### **3.3.2 Determinación concentración celular por densidad óptica.**

La Absorbancia o Densidad Óptica también fue utilizada como método indirecto para determinar la concentración celular, en el caso de la *Spirulina Plantensis*, cuyo conteo directo bajo el microscopio, se logró realizar exitosamente, se pudo establecer curvas de correlación lineal entre la concentración celular y la absorbancia. En el caso de la *Chlorella Vulgaris* que por su tamaño se dificultó el conteo celular directo bajo el microscopio, se utilizó curvas de correlación absorbancia-concentración obtenidas de la bibliografía [12].

Las correlaciones absorbancia-concentración (celular) son de tipo lineal, similares a la Ley de Beer que correlaciona la Absorbancia de un soluto de manera lineal con la concentración.

Para las mediciones de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Thermo Fisher Scientific Inc.) tal como se puede observar en la Figura 3.5. La absorbancia fue medida a 550 nm en contenedores propios del equipo.



Figura 3.3: Medición de absorbancia en espectrofotómetro

### 3.4 Diseño y operación de Fotobiorreactor con Airlifting

Para el escalamiento de la producción de las cepas de *Spirulina P.* y *Chlorella V.* se diseñó, envió a fabricar un fotobiorreactor con sistema de airlifting con la colaboración del Dr-Ing. Rodny Peñafiel, director de la Maestría en Desarrollo Energético Sustentable de la Universidad San Francisco de Quito. Se diseñó el fotobiorreactor con circuito interno de airlifting, con una entrada para aire/ $\text{CO}_2$  en el centro del mismo justo inferior a la sección del Upriser, esta sección es de ascenso de la fase gaseosa dentro del reactor y a la vez genera sustentación a que ascienda la fase acuosa, es un cilindro hueco, concéntrico al cilindro principal del reactor, el Downcomer es la sección externa al Riser y en este volumen tanto la fase gaseosa como acuosa tienen un patrón de flujo descendente. El material de construcción del reactor fue policarbonato para facilitar la incidencia de luz externa artificial, al mismo. El ingreso de gas se realizó utilizando el compresor de aire y

tanque de dióxido de carbono de una Columna de Absorción de Gas UOP7 (Armfield, Inc) así como los flujómetros y válvulas de esta para controlar la cantidades de ingreso de aire.

En la Figura 3.2 se puede observar un esquema básico de cómo se dispuso el fotobiorreactor en conjunto a los demás elementos utilizados para establecer el sistema airlifting y la iluminación del sistema. Tanto los flujos del compresor compresor de aire como los del tanque de CO<sub>2</sub>, pasan primero por un flujómetro independiente para definir el caudal de estos gases que luego se mezclan para ingresar al fotobiorreactor, que permite el escape de aire y CO<sub>2</sub> residuales así como oxígeno producto de la fotosíntesis.

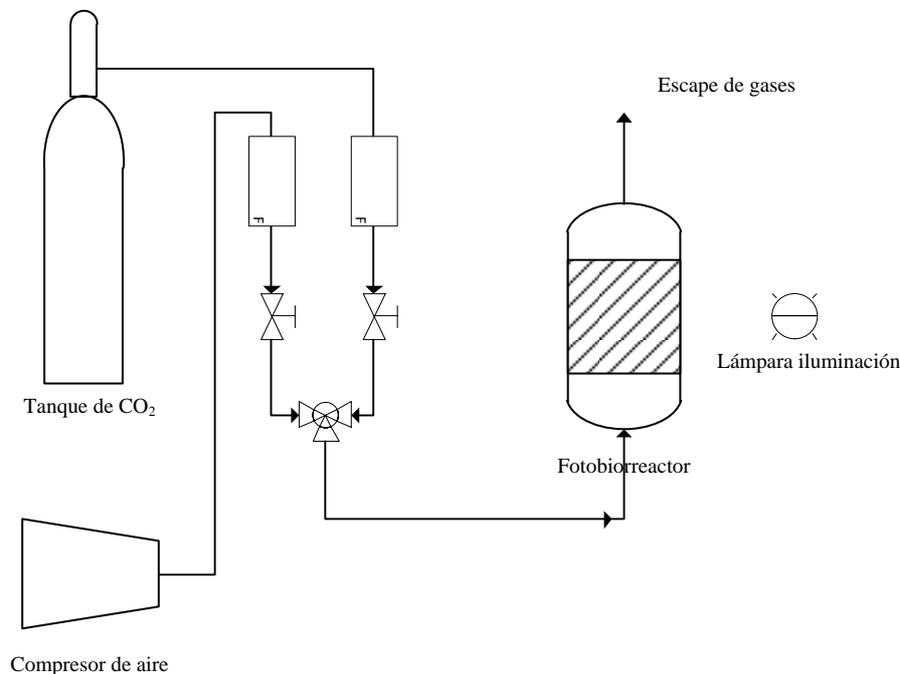


Figura 3.2 Esquema del sistema Airlifting-Fotobiorreactor

El ingreso de aire/CO<sub>2</sub> al fotobiorreactor se dispersó con un material poroso para formar las burbujas de menor tamaño en la sección central del fotobiorreactor, llamada uprizer, que es la zona de flujo ascendente de las fases acuosa y gaseosa. En la Figura 3.4 se puede observar el punto de ingreso de la aire/CO<sub>2</sub> justo en el centro y debajo del tubo concéntrico interior del fotobiorreactor.

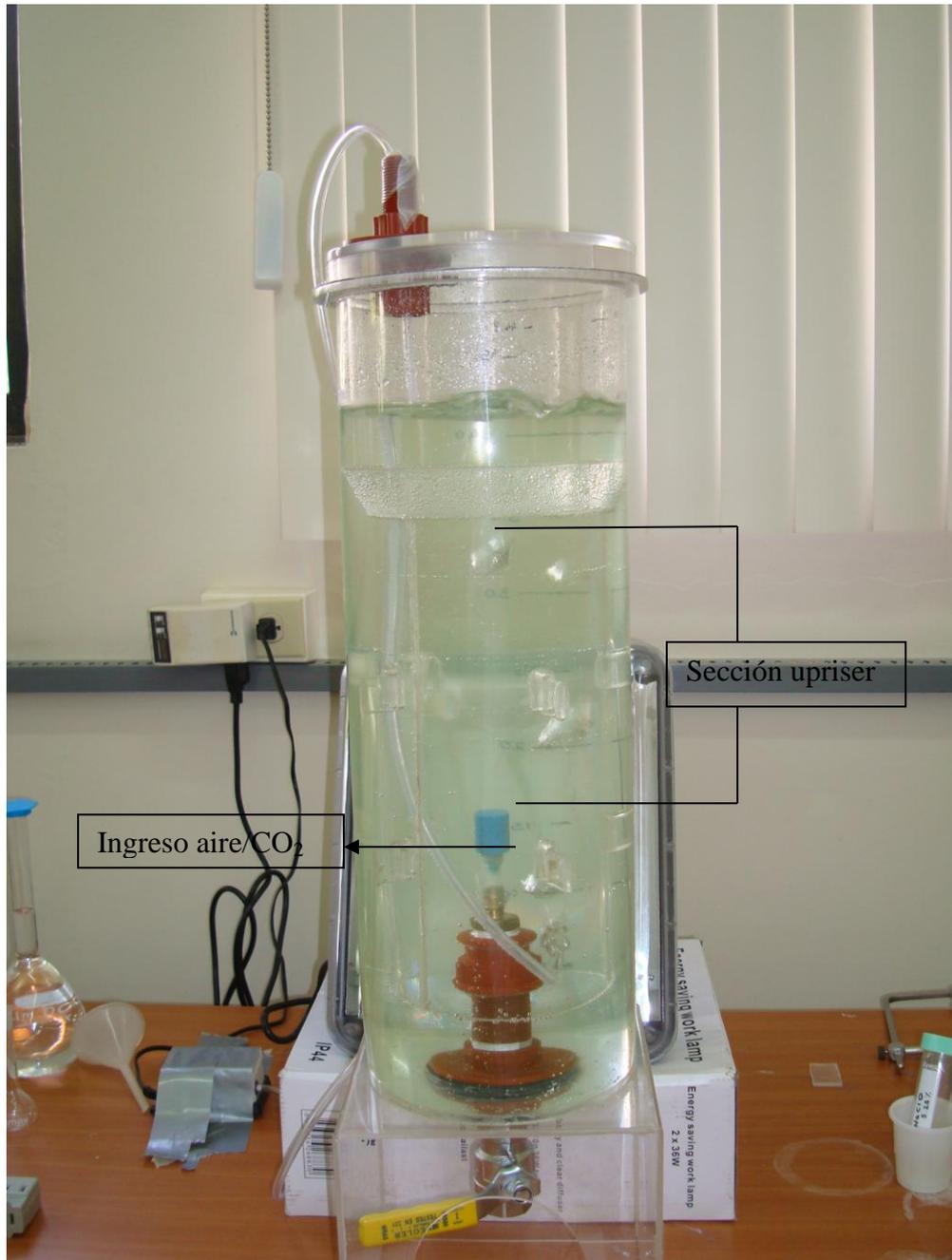


Figura 3.5: Sección flujo ascendente del fotobiorreactor con airlifting

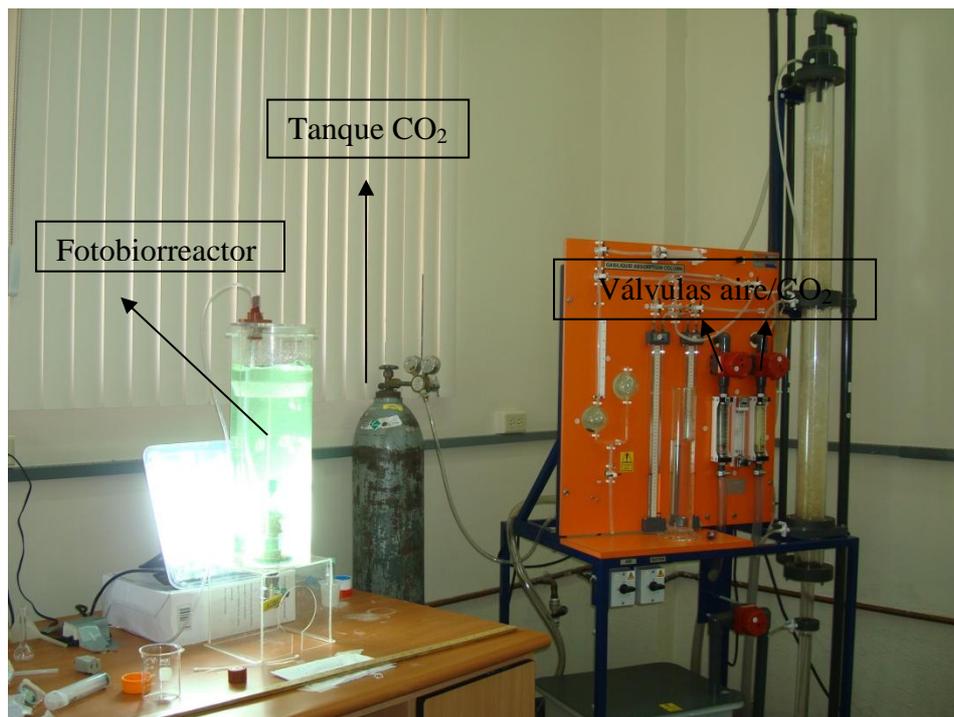


Figura 3.6: Fotobiorreactor Airlifting y sistema aire/CO<sub>2</sub>

El fotobiorreactor fue inoculado en dos lotes distintos con cada cepa a producirse, se agregó 0.5L de inóculo concentrado a 7 L de medio de cultivo propio para cada cepa. La operación se realizó con un ingreso permanente de aire de  $10 \frac{L}{min}$  generado por el compresor, más un ingreso de 2 horas por día de  $2 \frac{L}{min}$  de CO<sub>2</sub>. La iluminación se realizó con una lámpara fluorescente de 40 W, excepto en el cultivo de *Chlorella* que se utilizaron 2 lámparas en una fase de la producción. Se realizaron aproximadamente tres mediciones por duplicado, diarias de absorbancia para determinar la concentración, las muestras se tomaron con una jeringuilla en volúmenes de 5 mL e inmediatamente se midió la absorbancia en el equipo.

### 3.5 Recuperación de la biomasa

Debido a las diferencias entre las dos especies cultivadas, se realizaron diferentes procesos de recuperación de acuerdo a la especie. Estos procesos se realizaron para determinar las eficiencias de diferentes procesos de recuperación de biomasa de acuerdo a sus rangos de tamaño y que podría luego ser útil para la recuperación de una future especie de interés.

### 3.5.1. Filtración

La recuperación de la biomasa microalgal de *Spirulina* se realizó mediante filtración al vacío y posterior secado. La filtración se realizó con filtros cualitativos de papel, estos filtros fueron suficientes para la retención de la *Spirulina* ya que su tamaño superior a 100  $\mu\text{m}$  facilita la filtración de estas, el filtrado obtenido de este procedimiento presentó una absorbancia muy cercana a cero lo que indica que cerca del total de las microalgas fueron retenidas en el filtro. Los filtros con la biomasa retenida fueron luego ingresados a un horno a 65 °C para su secado.

El proceso de recuperación de la biomasa de *Chlorella Vulgaris* resultó requerir procesos de downstream más intensivos, debido al tamaño inferior a los 10  $\mu\text{m}$  de la *Chlorella V.* que se comporta en el medio de cultivo con características cercanas a un coloide [3], produciéndose que las células suspendidas no se atraigan fácilmente para formar conglomerados que facilitarían su filtración o sedimentación, por este motivo requieren ser microfiltradas; la microfiltración de las suspensiones de *Chlorella* en filtros de fibra de vidrio de 1.45  $\mu\text{m}$  permitieron una recuperación mayor al 90% , cuando se utilizaron filtros de cualitativos de papel se recuperó el 20%, se utilizaron también filtros Millex de flujo tangencial de 0.22  $\mu\text{m}$  con los que se recuperó más del 99% .

### 3.5.2 Centrifugación

Este es un proceso más intensivo de recuperación de biomasa y que se usó exclusivamente para la cepa de *Chlorella Vulgaris*, esta se realizó en una centrifugadora Fischer Scientific Modelo 228, esta centrifugadora permite centrifugar 6 tubos de aproximadamente 10 mL cada uno, es decir 60 mL en cada ciclo de centrifugación.

Tras el ciclo de centrifugación las células suspendidas se sedimentan al fondo del tubo de en una altura de menos de 1 cm quedando más de 9 cm de fase acuosa clarificada a la cual se mide la absorbancia final para luego calcular el porcentaje de remoción. Se centrifugaron lotes de 60 mL por 20 minutos.

### 3.5.3 Floculación del biocoloide de *Chlorella Vulgaris*

Se realizaron pruebas de floculación con tricloruro férrico entre 5 y 15 mg/L en sets de 3 vasos de 100 mL con agitadores magnéticos, un primer set de 3 jarras sin adición de coagulante. También se hicieron pruebas con otros dos set de jarras utilizando el floculante Poliacrilamida Catiónica [PAM+]. Se realizó la floculación con compuestos catiónicas, ya que estos neutralizan las cargas negativas de las células microalgales lo que permite se aglutinen [3]. Antes de empezar con el test de floculación se regula a pH 7 las muestras luego se agregaron los floculantes y se hizo una agitación rápida por 1 minuto y una agitación a baja velocidad por 20 minutos para luego dejar sedimentar las muestras.

Para tener un mejor control de la agitación y de procesar un volumen mayor se realizó la floculación en un equipo de Test de Jarras Phipps & Bird que permite hacer test de floculación en series de 6 jarras de 1000 mL, se dispuso 6 vasos de precipitación con 1000 mL de la suspensión de *Chlorella Vulgaris* cada uno. La suspensión presentaba una absorbancia de 0.786 y pH 9.02 el cual se neutralizó a pH 7. Se realizó tests de floculación en concentraciones de PAM+ entre 6 y 12 mg/L, luego de los ciclos de agitación rápida a 120 RPM por un minuto y agitación lenta a 15 RPM por 20 minutos; se deja sedimentar por 40 minutos y se empieza a realizar mediciones de absorbancia.

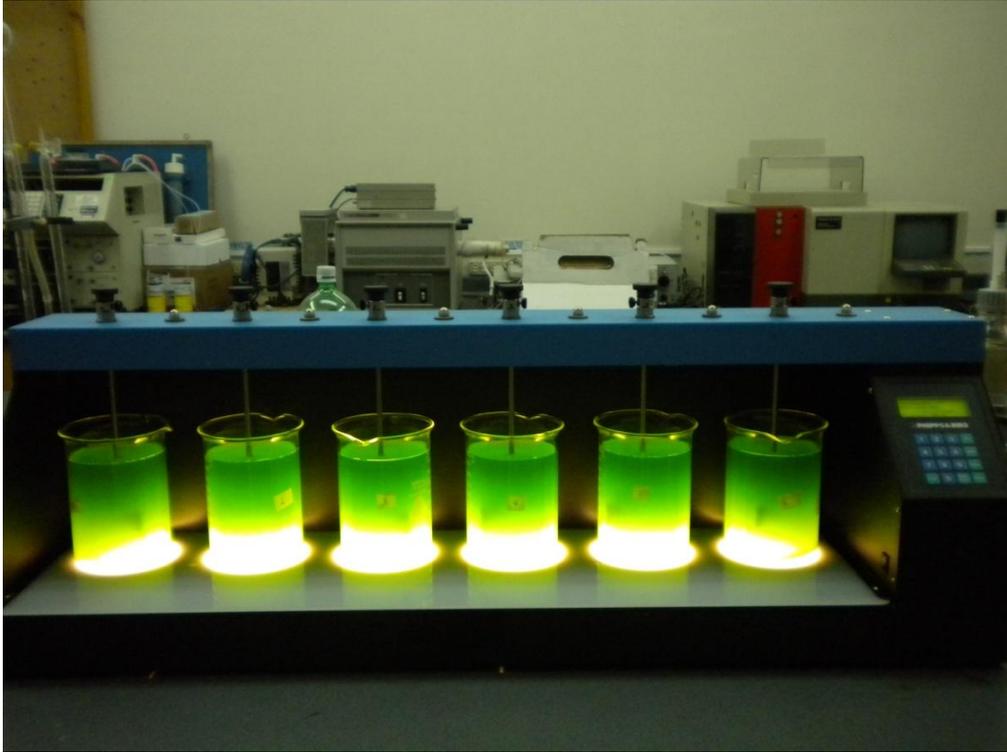


Figura 3.7 Floculación en Test de Jarras Phipps & Bird

## 4.RESULTADOS

### 4.1 Resultados obtenidos de los procesos de upstream

La identificación y separación tuvo principalmente el propósito de revisión de técnicas y metodologías, más que de la obtención de un inóculo viable para su escalamiento. Las especies identificadas no pudieron mantener pureza y se detectó contaminación de organismos externos en el microscopio, principalmente se presume por las estrictas necesidades de esterilidad en los procedimientos.

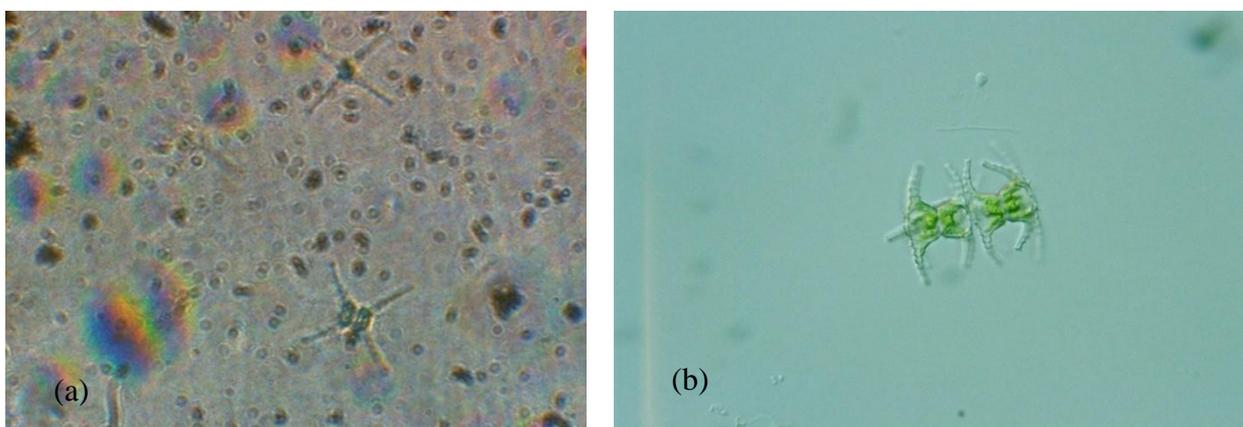


Figura 4.1: (a) Microalga observada USFQ (b) Clave identificación *Staurastrum Arachne*

La Figura 4.1 muestra la comparación entre una microalga observada y la clave de identificación con la que se compara, en la Figura 3.1 (a) también se puede observar la presencia de microorganismos ajenos a la especie de interés.

En la Figura 4.2 se puede ver el apareamiento de colonias sobre el agar, tras un proceso de estriamiento con hisopo de muestras acuosas con presencia del alga de interés, las estrias verdosas representan crecimiento algal.

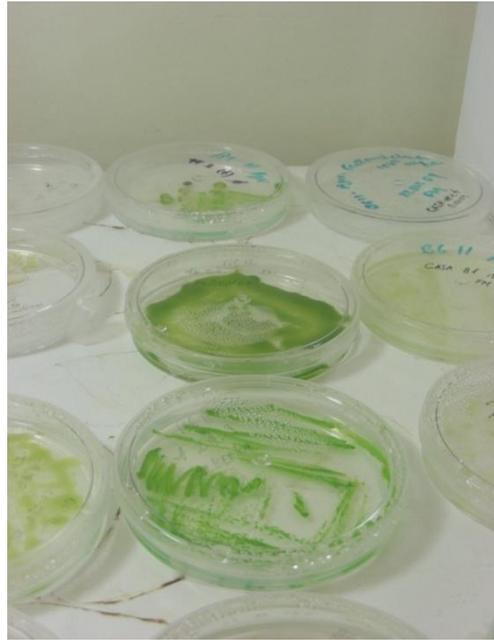


Figura 4.2: Separación de microalgas mediante estriado en agar

Para escalar sin embargo se necesitaban inóculos con mayor pureza, que no se logró con los métodos de aislamiento, que desde un principio fueron realizados principalmente con el propósito de explorar la técnica, ya que son procesos especializados de microbiología y biotecnología. Por esto motivo se obtuvieron inóculos puros de dos especies de amplio uso comercial como son la *Spirulina Plantensis* y la *Chlorella Vulgaris*, que fueron también verificados con las claves de identificación de especies.

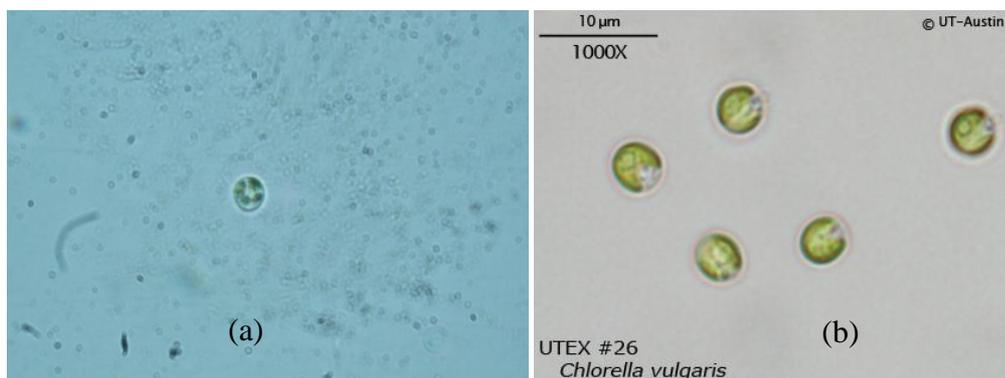


Figura 4.3: (a) Inóculo de *Chlorella Vulgaris* usado (b) Clave identificación *Chlorella Vulgaris*

En las Figuras 4.3 y 4.4 se observan los inóculos utilizados para la producción de biomasa microalgal y su previa identificación con claves visuales para el efecto.

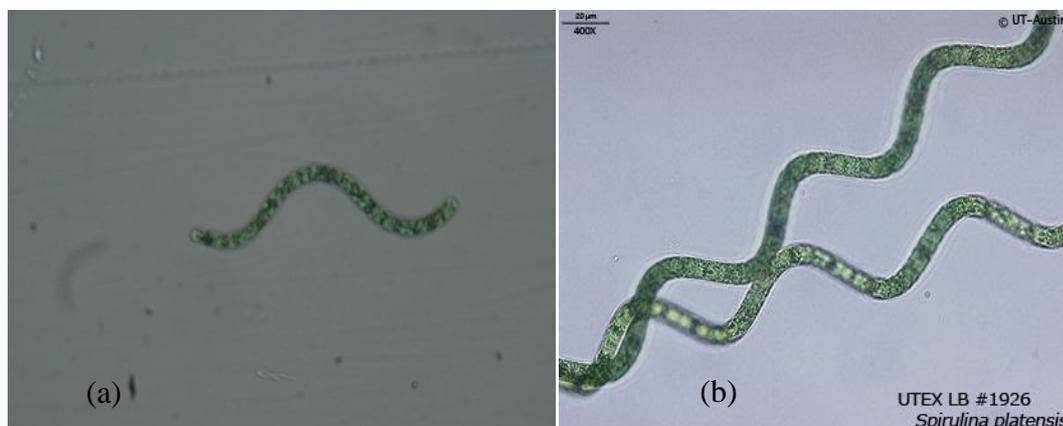


Figura 4.4: (a) Inóculo de *Spirulina Plantensis* usado. (b) Clave de identificación *Spirulina Plantensis*

Los inóculos de *Spirulina Plantensis* y *Chlorella Vulgaris* facilitados por investigadores de la PUCE, se lograron producir exitosamente tanto en volúmenes de 1L como en su escalamiento a 7.5L. En la Figura 4.5 se puede observar valores de concentración de *Spirulina Plantensis* en un volumen de 1L, este cultivo se realizó para preparar el inóculo para la producción de la cepa en el fotobiorreactor en un volumen de 7.5L.

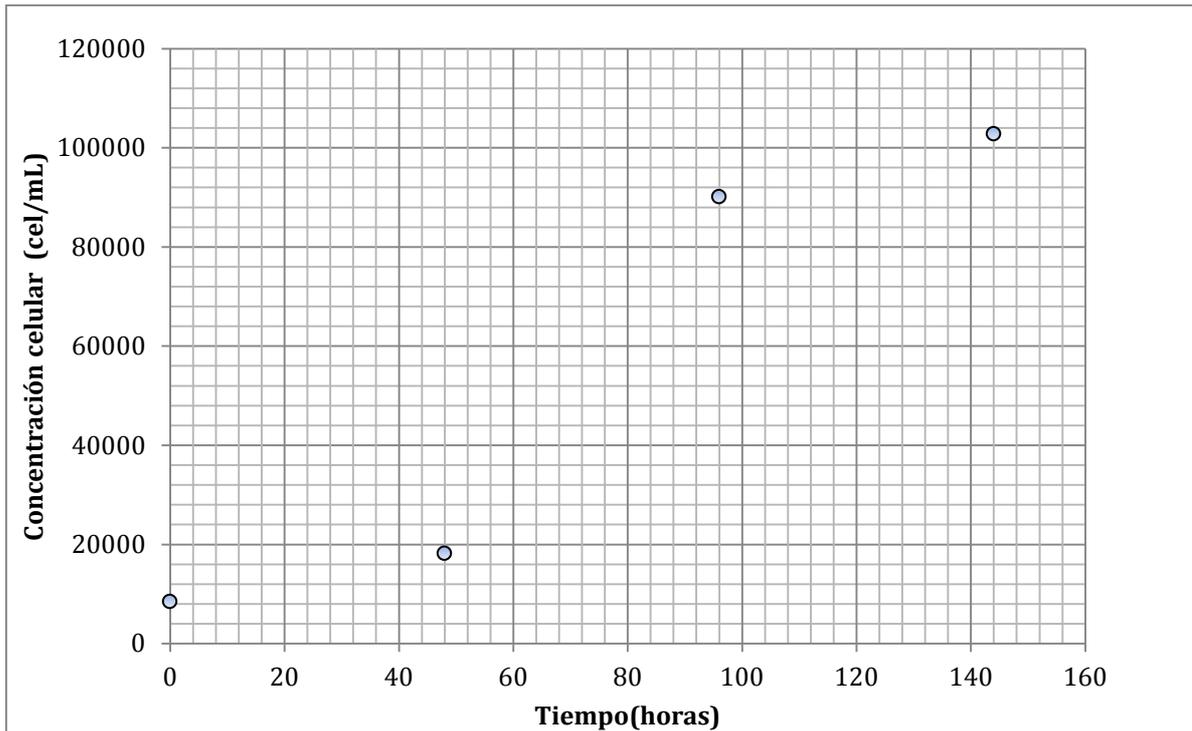


Figura 4.5: Preparación inóculo *Spirulina Plantensis* en vaso Erlenmeyer de 1L

El conteo de *Spirulina* mediante microscopia es de relativa facilidad debido a que la *Spirulina* es una microalga de tamaño superior a las 100 micras; pero el método de conteo por correlación absorbancia-concentración es mucho más ágil y práctico. Por lo que se realizó una curva de calibración absorbancia-concentración que se observa en la Figura 4.6 y durante la producción de la *Spirulina* en el fotobirreactor, se usó exclusivamente absorbancia para analizar el crecimiento celular.

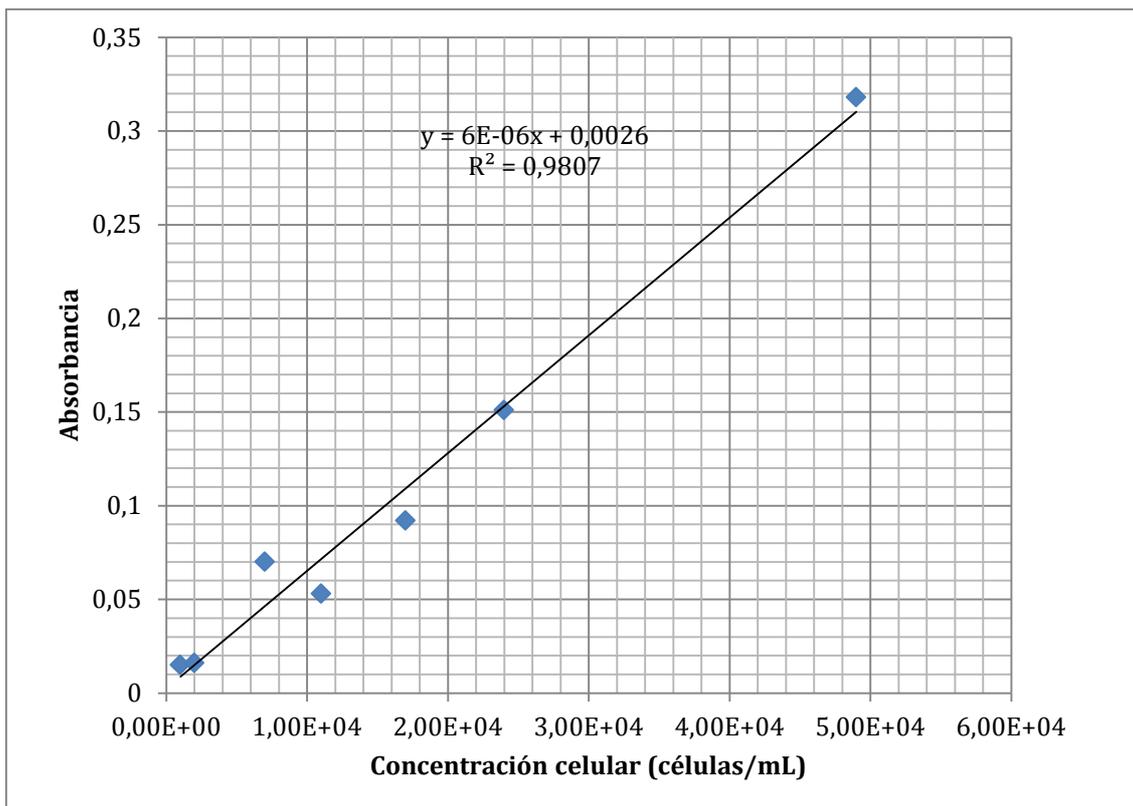


Figura 4.6: Curva Calibración Absorbancia-Concentración celular *Spirulina Plantensis*

## 4.2 Operación del Fotobiorreactor.

La primera característica a verificar del fotobiorreactor fue el funcionamiento del sistema de airlifting, para lo cual la fase gaseosa debía lograr producir por arrastre la ascensión de la fase acuosa en la sección del upriser indicada en la Figura 3.5; y el descenso de ambas fases en la sección del downcomer, que es el volumen externo al cilindro del upriser.

La cepa de *Spirulina Plantensis* fue la primera usada para poner en prueba el fotobiorreactor, por su mayor tamaño celular y facilidad de cultivo, la concentración celular se determinó mediante absorbancia, previa elaboración de una curva de calibración absorbancia-concentración celular, que se indica en la Figura 4.6.

Durante toda la operación del Fotobioreactor con *Spirulina Plantensis* de cerca de 300 horas, se pudo observar un crecimiento de tipo exponencial según se puede observar en la curva de regresión mostrada en la Figura 4.7

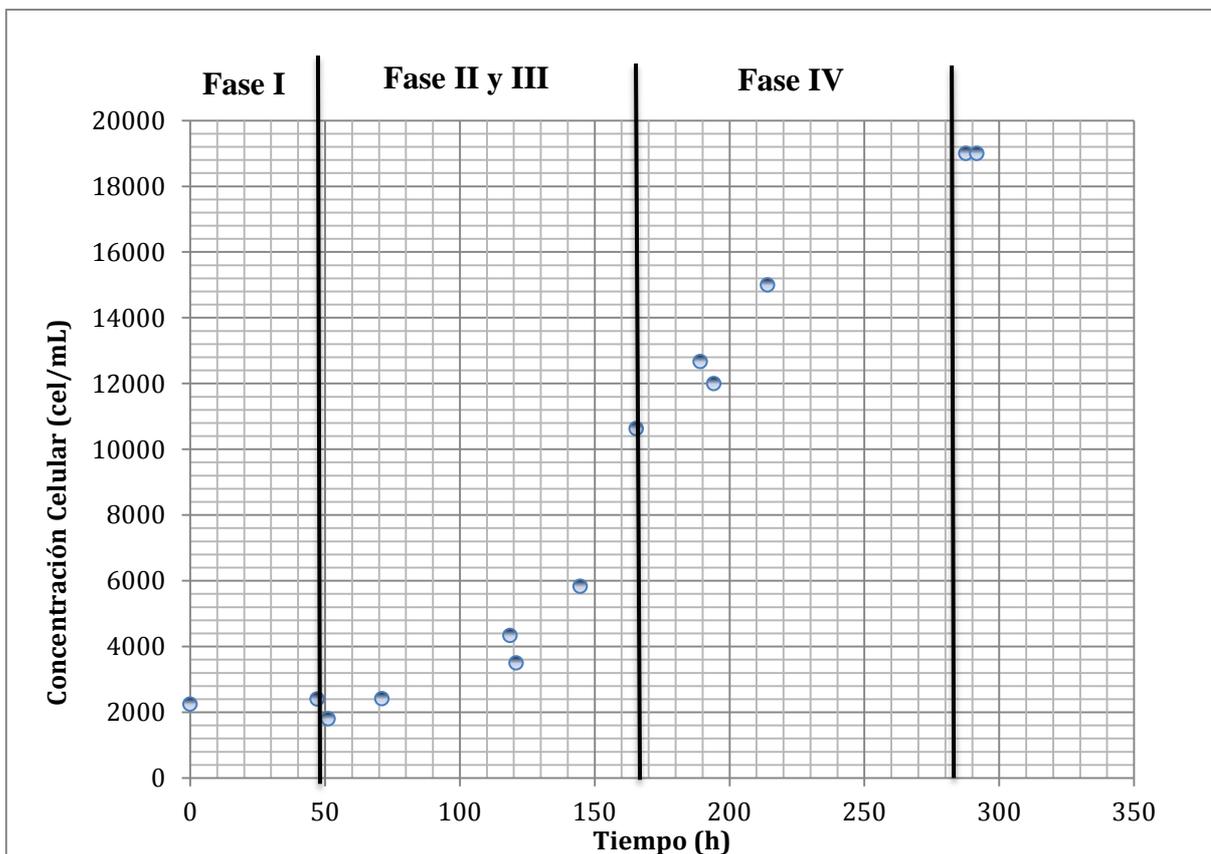


Figura 4.2: Curva de Crecimiento de *Spirulina* en el Fotobioreactor

En la Figura 4.2 se observa hay una fase de aclimatización (Fase I) en que la concentración inicial no se sostiene e incluso decae, comienza a aumentar y decae nuevamente, luego aparece una aceleración (Fase II) previa a un crecimiento exponencial que se observa en la (Fase III) que luego es seguida por una fase de decaimiento (Fase IV).

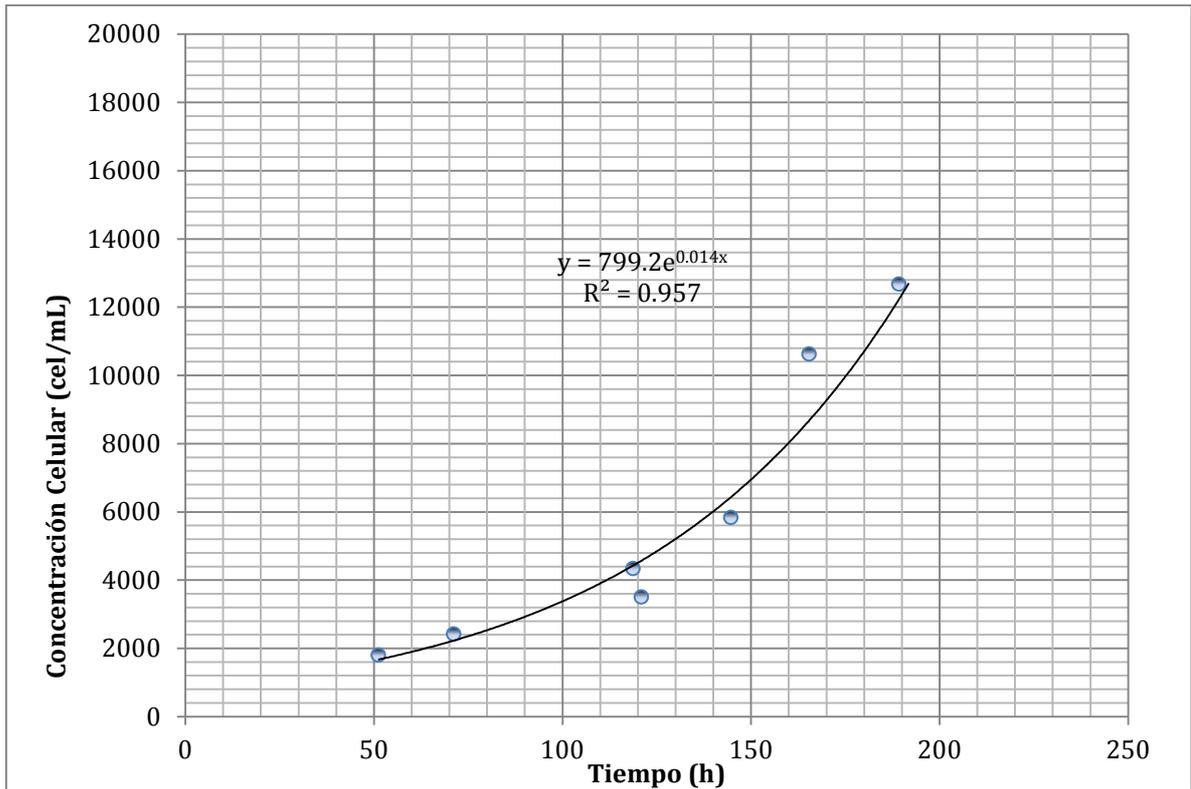


Figura 4.3: Curva de crecimiento en la fase exponencial de Spirulina en fotobiorreactor

En la Figura 4.3 se presenta la curva de crecimiento de la Spirulina Plantensis en la fase exponencial y se obtiene el ajuste de esos datos a una ecuación de orden exponencial, al obtener la primera derivada de dicha ecuación que se muestra en la Ecuación 4.1 se obtiene la velocidad de crecimiento.

$$\frac{\partial}{\partial x}(799.2 e^{0.014x}) = 11.1888 e^{0.014x}$$

Ecuación 4.1

Esta velocidad alcanza su máximo a las 189.5 horas de operación y da una velocidad máxima de  $158.84 \frac{\text{células}}{\text{mL h}}$ .

La producción de Chlorella Vulgaris no mostró fases de crecimiento tan claramente definidas como en el caso de la Spirulina Plantensis, presumiblemente por el tamaño inferior de esta especie de microalga, que le vuelve más susceptible a las fuerzas

hidrodinámicas que pudiesen dañar a las células y no favorecer un crecimiento exponencial marcado. Para favorecer el crecimiento celular, alrededor de las 440 horas de operación del fotobioreactor, se añadió otra lámpara fluorescente, diametralmente opuesta a la ya presente, y se observó un pico de crecimiento durante 20 horas, que luego decayó.

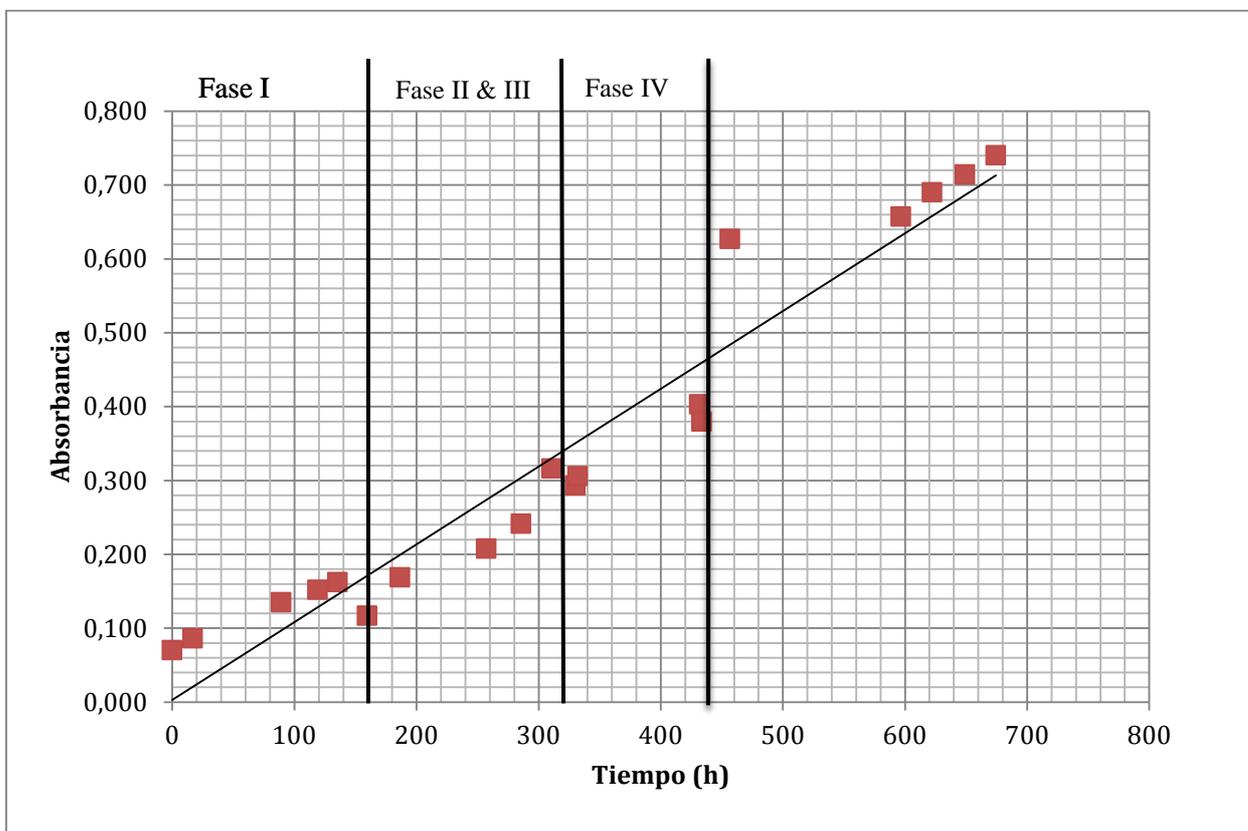


Figura 4.4: Curva de crecimiento de Chlorella Vulgaris en el Fotobioreactor.

Debido a que no se obtienen suficientes puntos en la fase exponencial (Fase IV) no se realice un ajuste de los datos a un modelo de cinética exponencial.

### 4.3 Resultados Procesos Downstream.

Se procesaron 5400 mL del contenido del Fotobioreactor con Spirulina mediante filtración al vacío con papel cualitativo, obteniéndose una medición de aproximadamente 0 de absorbancia de la fase clarificada, lo que indica una retención de cerca del 100% en el papel filtro. Posterior al secado, se obtuvo una masa de 4.7452g de biomasa seca de Spirulina.

Se comparó la recuperación de biomasa de *Chlorella Vulgaris* mediante filtración con papel cualitativo, microfiltración con fibra de vidrio y mediante filtración tangencial con filtros Millex, obteniéndose las recuperaciones de biomasa indicadas en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Comparación métodos de filtración de biomasa *Chlorella Vulgaris*

| <b>Filtro</b>                   | <b>Absorbancia inicial</b> | <b>Absorbancia Filtrado</b> | <b>% recuperación filtro</b> |
|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <b>Millex 0.22 micras</b>       | 0.895                      | 0.0037                      | 99.59                        |
| <b>Fibra vidrio 1.45 micras</b> | 0.895                      | 0.0270                      | 96.98                        |
| <b>Papel cualitativo</b>        | 0.895                      | 0.6900                      | 22.91                        |

Como se observa en la Tabla 4.1 la recuperación de la biomasa es muy pequeña si se usa filtración regular al vacío, comparado con los otros métodos de filtración que son 4 veces más eficientes.

Los filtros Millex permitieron una elevada recuperación de biomasa, estos filtros funcionan con una jeringuilla que da presión a la suspensión para que atraviese este filtro de flujo tangencial. Este filtro, sin embargo, presentó la dificultad de que se taponaba con más de 50 mL de suspensión microalgal por lo que no resulta una opción para recuperar biomasa con fines prácticos.

Con los filtros de fibra de vidrio también se obtiene una alta recuperación, esta filtración se lleva a cabo al vacío y permite procesar 250 mL en cada disco de filtración de 75 mm, el volumen que se puede procesar en estos filtros es aún muy bajo y además el tiempo de filtración es muy elevado, además que el costo de estos filtros vuelve poco práctico considerar a este tipo de filtración como eficiente tanto en términos tecnológicos como económicos.

La centrifugación fue otro proceso utilizado para recuperar la biomasa, que aunque es eficiente en porcentaje de recuperación, solo permitió procesar volúmenes limitados a 60 mL por cada lote, en tiempos de centrifugación de 20 minutos. Otra dificultad es recuperar

la biomasa sedimentada, ya que esta se adhiere fuertemente a las paredes de los tubos de ensayo.

Tabla 4.2: Recuperación de biomasa de *Chlorella Vulgaris* mediante centrifugación

| Absorbancia inicial | Absorbancia final | % recuperación |
|---------------------|-------------------|----------------|
| 0.508               | 0.009             | 98.23          |
| 0.508               | 0.0045            | 99.11          |
| 0.508               | 0.0085            | 98.33          |
| 0.508               | 0.0095            | 98.13          |

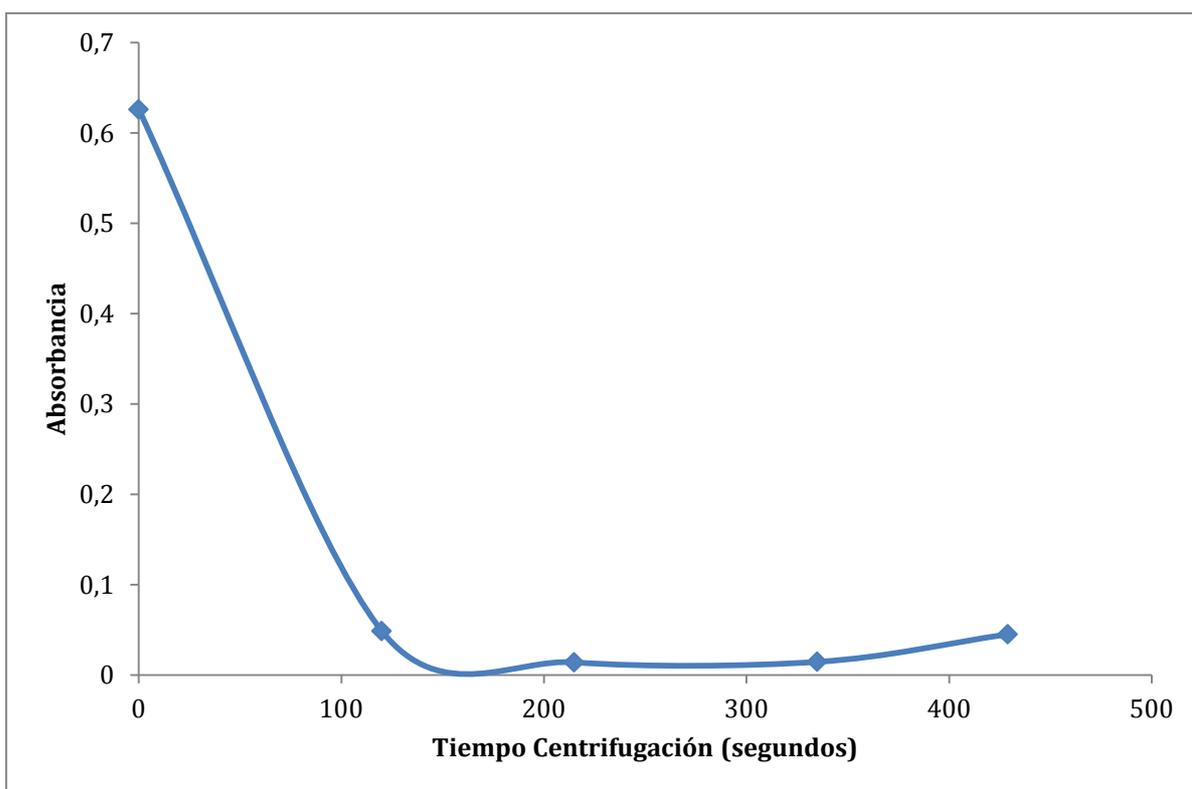


Figura 4.5: Recuperación de *Chlorella Vulgaris* en función de tiempo de centrifugación

Se realizó también recuperación de biomasa de *Chlorella Vulgaris* mediante floculación mediante distintas floculantes, con el tricloruro férrico no se observó formación de flóculos ni sedimentación apreciable por lo que se descartó el uso de este compuesto. Con el uso de PAM+ se pudo observar los resultados de recuperación indicados en la Figura 4.5.

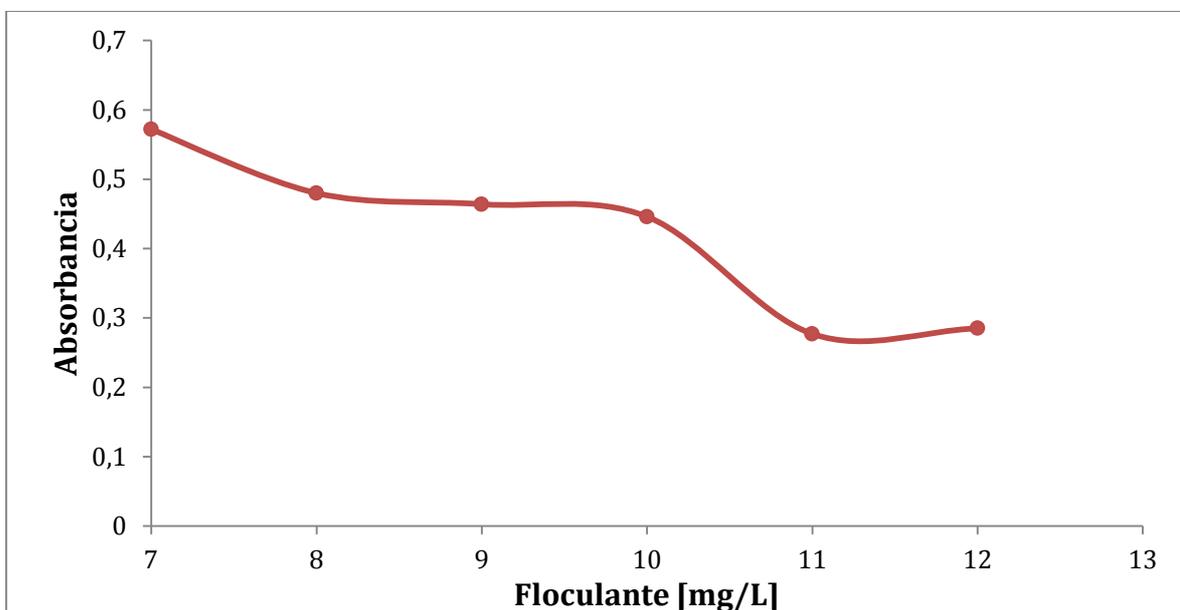


Figura 4.6: Floculación con concentraciones de PAM+ entre 7 y 12 mg/l

A partir de una absorbancia inicial de 0.797, se observa en la Figura 4.5 la absorbancia de la fase clarificada luego de la floculación a distintas concentraciones de PAM+. Se puede observar que más allá de los 11 mg/L de dosis de floculante ya no se incrementa la capacidad de recuperación de la biomasa, por lo que se consideraría que 11 mg/L sería la dosis óptima.

Aunque la eficiencia de recuperación de la biomasa mediante este proceso fue inferior a la que se obtuvo en la centrifugación, mediante este método se pudo procesar volúmenes superiores a los procesados mediante centrifugación, de apenas 60 mL por lote, mientras que en el proceso de centrifugación de 6L por lote.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La presente investigación cubrió los procesos básicos para la producción y recuperación de biomasa microalgal. Dividiéndose la primera parte en operaciones de producción de biomasa (upstream). Y la siguiente en procesos de recuperación (downstream).

La primera fase exploró métodos para identificar y separar microalgas de ocurrencia local, aunque no se logró el aislamiento de una cepa viable, fue importante conocer las metodologías requeridas para este propósito así como las áreas especializadas de las ciencias biológicas para estos fines.

También se logró la preparación de los inóculos de *Chlorella Vulgaris* y *Spirulina Plantensis* en volúmenes de 1L y el diseño de un fotobioreactor con airlifting de 7.5L de capacidad. Debido a las características de crecimiento de estos microorganismos, fue de especial importancia el diseño y construcción del fotobiorreactor con airlifting que promueven el mezclado y agitación sin fuerzas que dañen las células microalgales y que favorezcan el contacto con la fase gaseosa compuesta por aire y dióxido de carbono; además el sistema airlifting facilita la expulsión del oxígeno producido durante el proceso que podría acumularse en el bioreactor y producir inhibición del crecimiento [10].

Con la cepa de *Spirulina Plantensis* se observaron las fases de crecimiento típicas de los microorganismos, de una manera más marcada y clara, en la fase exponencial se alcanzó una velocidad máxima de crecimiento de  $158.84 \frac{\text{células}}{\text{mL h}}$ .

La cepa de *Chlorella Vulgaris* no mostró en las 700 horas de crecimiento fases tan claramente definidas como en el caso de la *Spirulina Plantensis*, esto puede deberse a que por su tamaño inferior a los 10  $\mu\text{m}$  en comparación a los aproximadamente cerca de 100  $\mu\text{m}$ , estas células son más sensibles a las fuerzas hidrodinámicas.

Con la cepa de *Spirulina Plantensis* se lograron recuperaciones cercanas al 100% tan solo con filtración al vacío con papel filtro cualitativo regular, esto debido al tamaño de cerca de 100  $\mu\text{m}$  de esta especie, que facilita su retención en materiales filtrantes con tamaños de poro más grandes en comparación a los que se necesita para filtrar la *Chlorella Vulgaris*.

La recuperación de *Chlorella Vulgaris* demostró ser más exigente por el tamaño de esta especie, inferior a los 10  $\mu\text{m}$ . Se requirieron operaciones de recuperación más intensivas, como centrifugación, floculación y microfiltración. Con la centrifugación y microfiltración

se obtuvieron recuperaciones de biomasa superiores al 90%. Sin embargo los volúmenes de procesamiento fueron relativamente muy bajos, inferiores a 100 mL por lote, a diferencia de con la floculación que se logró procesar 6L por lote usando el equipo de test de jarras de Phipps & Bird. Con la recuperación por floculación se obtuvieron recuperaciones de hasta 65% con 11 mg/L de Poliacrilamida Catiónica.

Se recomienda realizar varios cultivos de la cepa de *Chlorella Vulgaris* en el fotobiorreactor para obtener datos de crecimiento más definidos, así como realizar la operación del fotobiorreactor en secuencias más largas de tiempo para observar las fases de crecimiento más completas.

Se recomienda para optimizar resultados, realizar investigación de tipo multidisciplinario en la producción, recuperación y aplicación industrial de las microalgas. Se requiere investigación de áreas muy especializadas como microbiología y biotecnología que se complementen con la ingeniería, en procesos como la identificación y separación de microalgas, su preservación y establecimiento de colecciones con especies locales, así como para la optimización de la producción y recuperación. Sería importante realizar curvas de calibración absorbancia-concentración celular de *Chlorella Vulgaris* para tener mejores datos de conteo celular, debido a la dificultad y demanda de tiempo que presentó el conteo microscópico.

En futuros estudios también sería importante realizar investigaciones de optimización de la producción de microalgas de acuerdo a las condiciones de una aplicación industrial real, como por ejemplo alimentar el CO<sub>2</sub> de una fuente de combustión industrial y estudiar la mezcla óptima de aire/ CO<sub>2</sub>. En el caso de las aplicaciones para tratamiento de aguas residuales sería importante evaluar el perfil de crecimiento microalgal con distintas fuentes de sustrato, ya que en la presente investigación se realizaron únicamente con medios sintéticos de cultivo.

## 6. REFERENCIAS

1. Andersen, R. A. (2005). *Algal culturing techniques*. Burlington, Mass: Elsevier/Academic Press.
2. Ugwu, C. W., Aoyagi H. & Uchiyama H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99, 4021-4028
3. Tester, J. W. (2005). *Sustainable energy: Choosing among options*. Cambridge, Mass: MIT Press.
4. Sheehan, J., & National Renewable Energy Laboratory (U.S.). (1998). *A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from algae*. Golden, Colo.: National Renewable Energy Laboratory.
5. Service, R. F. (2009). ExxonMobil Fuels Venter's Efforts To Run Vehicles on Algae-Based Oil. *Science Magazine*, 325, 379.
6. Bloomberg Business (2013). *Exxon Refocusing Algae Biofuel Program After \$ 100 Million Spend*. Obtenido el 31 de Mayo 2014 de <http://www.bloomberg.com/news/articles/2013-05-21/exxon-refocusing-algae-biofuels-program-after-100-million-spend>
7. Richmond A. (2004) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd.
8. Brennan L, Owende P. (2009). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
9. Mata, Teresa M., Antonio A. Martins, and Nidia S. Caetano. Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review. *Science Direct* 14.1 (2010): 217-32.

10. Flickinger, M. C., & Drew, S. W. (1999). *The encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: Wiley.
11. Molina Grima E., et al. Recovery of microalgae and metabolites: Process options and economics. *Biotechnology Advances* 20 (2003) 491–515
12. H. Berberoglu et al. Radiation characteristics of *Botryococcus braunii*, *Chlorococcum littorale*, and *Chlorella* sp. Used for CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* (2009)