



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**Instalación y Monitoreo de un Fotobiorreactor para el Cultivo Autotrófico y  
la Extracción de Lípidos de Microalgas *Chlorella* para la Producción de  
Biodiesel**

**Geovanna Lucia Ruiz Cabrera**

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

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

**Quito, mayo del 2015**

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**Instalación y Monitoreo de un Fotobiorreactor para el Cultivo Autotrófico y la  
Extracción de Lípidos de Microalgas *Chlorella* para la Producción de Biodiesel**

**Geovanna Lucía Ruiz Cabrera**

Valeria Ochoa-Herrera, Ph.D.,

Directora del Proyecto

-----

Rodny Peñafiel, Ph.D.,

Miembro del Comité

-----

René Parra, Ph.D.,

Miembro del Comité

-----

Ximena Córdova, Ph.D. ,

Decana de la Escuela de Ingeniería

Colegio de Ciencias e Ingeniería

-----

Quito, mayo de 2015

© 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: Geovanna Lucia Ruiz Cabrera

C.I.: 171973497-0

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2015

## **Agradecimientos**

A Valeria Ochoa-Herrera Ph.D., directora de tesis, profesora de carrera y amiga por su incondicional apoyo en la realización el proyecto. Por creer en mí y guiarme a lo largo de la carrera.

A mis profesores y miembros de Comité de Tesis por los conocimientos compartidos durante toda la carrera. A Carlos Mena Ph.D. por ser un gran mentor y amigo.

A mi familia por ayudarme a levantar en cada obstáculo y por su infinito amor.

A mis amigos y compañeros de carrera por compartir el viaje conmigo.

## Resumen

Biodiesel a partir de microalgas es un biocombustible de tercera generación. Los biocombustibles de tercera generación buscan desplazar la producción de combustibles a partir de monocultivos de productos alimenticios. Algunas de las principales ventajas de la producción de biodiesel a partir de microalgas son disminución de áreas de cultivo, captura de dióxido de carbono y oxigenación del aire. El objetivo de este proyecto de investigación fue instalar y monitorear un fotobiorreactor (photobioreactor, PBR) tubular de 10 L con flujo de aire ascendente para el cultivo autotrófico de una cepa nativa de microalga. En la primera fase del estudio, se evaluó el crecimiento autotrófico de diferentes cepas de microalgas en condiciones batch y se estableció que *Chlorella sp.* fue la adecuada para montar el fotobiorreactor tubular ya que presentó valores de densidad óptica (DO) cercanos a 2.000 en las longitudes de onda de 600, 680 y 750 nm. A continuación se instaló el PBR con un volumen de microalgas de 7.2 L en un medio de proteosa con una concentración de 0.10 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio. Las condiciones de cultivo de las microalgas fueron optimizadas para obtener la mayor tasa de producción de lípidos. El flujo de aire óptimo fue 3 L min<sup>-1</sup> fue provisto a través de dispersores para asegurar una mezcla completa y evitar la sedimentación de las microalgas y el rompimiento celular. Una cosecha y cambio de medio de 200 mL diarios (2.5 % de volumen de algas) fueron empleados para mantener un crecimiento constante de las *Chlorella sp.* en el PBR. La iluminación adecuada en el PBR fue provista a través de 5 lámparas fluorescentes de luz fría de 20W en un periodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad correspondientes a una radiación fotosintéticamente activa de 124.13 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. El crecimiento de algas en el fotobiorreactor tubular fue monitoreado en términos de DO, densidad de algas (g L<sup>-1</sup>) y contenido de lípidos (%w/w). La densidad de algas varió entre valores de 0.04 a 1.45 g L<sup>-1</sup>. La DO registró valores máximos de 2.92 (600 nm), 3.51 (680 nm) y 2.49 (750 nm) a los 66 días de instalado el PBR. El contenido de lípidos más elevado fue de 20.23 % w/w obtenido a los 69 días de instalado el PBR y de 33.53% w/w obtenida una semana después de ser instalados los dispersores en el PBR (a los 123 días de funcionamiento). La tasa de producción de lípidos obtenida fue de 0.414 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

## Abstract

Biodiesel from microalgae is a third generation biofuel. Third generation biofuels seek to shift the monoculture food crops fuel production. Some of the main advantages of biodiesel production from microalgae are small areas of culture, carbon dioxide capture from the air and oxygen production. The purpose of the project was to install and monitor a 10 L air-lift tubular photobioreactor (PBR) for autotrophic microalgae cultivation. Within the study, the performance of different strains was evaluated and determined that *Chlorella sp.* was the suitable one for the tubular photobioreactor set-up since it recorded optical density values greater than  $>2.000$  in the wavelength of 600, 680 and 750 nm. The initial algal volume for the installation of the photobioreactor was 7.2 L with a sodium bicarbonate concentration of  $0.10 \text{ g L}^{-1}$ . Improved harvesting conditions are proposed to increase the lipid content of the microalgae. An aeration flow of  $3 \text{ L min}^{-1}$  was provided to the PBR to assure complete mixing avoid sedimentation and cell disruption. A 2.5% daily volume extraction of the total work volume of the PBR and replacement with new medium is recommended to keep a constant growth of *Chlorella sp.* in the PBR. The lightning supply was provided by five white fluorescent cold 20 W lamps with 12 hours of light and darkness, respectively. The photosynthetically active radiation (PAR) corresponded to  $124.13 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . The performance of the microalgae in the photobioreactor was monitored in terms of optical density (absorbance), algal density ( $\text{g L}^{-1}$ ) and lipid content (% w/w). Algal density varied between 0.04 and  $1.45 \text{ g L}^{-1}$ . The greater optical density found was 2.92 (600 nm), 3.51 (680 nm) y 2.49 (750 nm). The highest lipid contents found was 20.23% w/w, sixty nine days after the installation and 33.53%w/w obtained a week after the dispersers were installed. The lipid productivity obtained was  $0.414 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

## Tabla de Contenido

1. Introducción .....	14
1.1. Energías renovables.....	16
1.2. Biocombustibles .....	16
1.2.1. Situación de los biocombustibles a nivel mundial y en el Ecuador.....	19
1.2.2. Producción de Biocombustibles en el Ecuador .....	21
1.3. Biodiesel.....	21
1.4. Microalgas.....	23
1.4.1. Uso de microalgas para la producción de biodiesel .....	24
1.4.2. Fotobiorreactores para la producción de biodiesel a partir de microalgas .....	26
2. Justificación.....	28
3. Objetivos .....	29
3.1. Objetivo general .....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. Materiales y Métodos .....	30
4.1. Reactivos .....	30
4.2. Microalgas.....	30
4.3 Medio de Cultivo.....	30
4.3.1. Medio de Proteosa.....	31
4.3.2. Medio con Fertilizante .....	31
4.4. Crecimiento de microalgas.....	32
4.5. Montaje del fotobiorreactor tubular .....	33
4.6. Métodos analíticos para el monitoreo de algas .....	34
4.6.1. Medición de la densidad de biomasa de algas.....	34
4.6.2. Medición del porcentaje de lípidos .....	35
4.7. Evaluación del efecto de fertilizante .....	37
4.8. Métodos analíticos para parámetros físico-químicos .....	37
4.8.1. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno .....	37
4.8.2. Amonio.....	38
4.8.3. Nitratos .....	38
4.8.4. Fosfatos .....	39
4.8.5. Conductividad .....	40

4.8.6. Oxígeno disuelto (OD) .....	40
4.8.7. Potencial de hidrógeno (pH) .....	40
4.8.8. Temperatura .....	40
5. Resultados y Discusión .....	41
5.1. Montaje del fotobiorreactor tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas .	41
5.1.1. Crecimiento de microalgas <i>Chlorella</i> en bioensayos en modo de operación batch .....	41
5.1.2. Montaje del fotobiorreactor (PBR) tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas	55
5.2. Condiciones de operación del fotobiorreactor (PBR) tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas para la optimización de la tasa de producción de lípidos.....	57
5.2.1. Aireación .....	60
5.2.2. Alimentación e iluminación .....	63
5.3. Monitoreo del fotobiorreactor tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas	66
5.3.1. Densidad óptica (DO), biomasa de algas y contenido de lípidos .....	66
5.3.2. pH, conductividad, oxígeno disuelto y temperatura.....	70
5.3.3. Nitrito, amonio y fosfato .....	73
5.4. Efecto de la concentración de nutrientes en la tasa de producción de lípidos en el fotobiorreactor tubular.....	76
6. Conclusiones .....	82
7. Recomendaciones.....	83
8. Bibliografía .....	84
9. Anexos.....	89
Anexo 1 .....	89

## Índice de Tablas

Tabla 1. Comparación de propiedades de los combustibles fósiles vs biocombustibles. Fuente: Elaboración propia a partir de (Brower et al., 2014).....	22
Tabla 2. Comparación de distintas fuentes de materia prima para la producción de biodiesel. Fuente: (Fernández et al., 2012).....	22
Tabla 3. Contenido de lípidos y productividades de diferentes cepas de microalga <i>Chlorella</i> . Fuente: Elaboración propia a partir de (Mata et al., 2010).....	24
Tabla 4. Datos de densidad celular y contenido de lípidos de la cepa <i>Chlorella sp.</i> previo a la instalación del fotobiorreactor, en los ensayos batch. ....	52
Tabla 5. Comparación de la composición del medio de proteosa y del fertilizante líquido.....	76
Tabla 6. Densidad celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) y contenido de lípidos (% w/w) de los bioensayos del efecto del fertilizante .....	78

## Índice de Figuras

Figura 1. Distribución global de la producción energética para el 2012. Fuente: (IEA, 2013).....	15
Figura 2. Producción global de ( ) etanol, ( ) biodiesel y ( ) aceite vegetal hidrogenado, periodo 2000-2013. Fuente: REN21, 2014. Renewables 2014 Global Status Report (Paris: REN 21 Secretariat).....	18
Figura 3. Mapa mundial de producción de bioenergía (biocombustibles). Fuente: REN21 Renewables Interactive Map en <a href="http://www.map.ren21.net/#fr-FR/search/by-technology/8,11,29,122">http://www.map.ren21.net/#fr-FR/search/by-technology/8,11,29,122</a> .....	20
Figura 4. Descripción general del proceso de obtención de biodiesel a partir de microalgas. Fuente: Elaboración propia a partir de (Mata et al., 2010).....	25
Figura 5. Tipo de sistemas de cultivo de microalgas. Leyenda: A la izquierda se presenta un sistema abierto (estanque de rodadura) y a la derecha un sistema cerrado (PBR). Fuente: (Chisti, 2007).....	27
Figura 6. Cultivos semi-batch de las cepas <i>Chlorella</i> sp. y <i>Chlorella vulgaris</i> . Fotografía: Geovanna Ruiz .....	43
Figura 7. Monitoreo de crecimiento de algas mediante medición de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm para ensayos semi-batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y agitación manual una vez al día. a) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de mayo 2013. b) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de agosto 2013. Leyenda: (— —) Nativa I, (—◆—) CL USA 1, (—■—) CL USA 2, (—▲—) CL USA 3, (—×—) EXP USA 1, (••*••) EEUU 1, (—●—) EEUU2; la línea vertical corresponde al día en el que se cambió de medio.....	44
Figura 8. Monitoreo de crecimiento de algas mediante medición de absorbancia a una longitud de onda de 680 nm para ensayos semi-batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. a) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de mayo 2013. b) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de agosto 2013. Leyenda: (— —) Nativa I, (—◆—) CL USA 1, (—■—) CL USA 2, (—▲—) CL USA 3, (—×—) EXP USA 1, (••*••) EEUU 1, (—●—) EEUU2; la línea vertical corresponde al día en el que se cambió de medio. ....	46
Figura 9. Monitoreo de crecimiento de algas mediante medición de absorbancia a una longitud de onda de 680 nm para ensayos semi-batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. a) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de mayo 2013. b) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de agosto 2013. Leyenda: (— —) Nativa I, (—◆—) CL USA 1, (—■—) CL USA 2, (—▲—) CL USA 3, (—×—) EXP USA 1, (••*••) EEUU 1, (—●—) EEUU2; la línea vertical corresponde al día en el que se cambió de medio. ....	48
Figura 10. Monitoreo de crecimiento de algas mediante medición de absorbancia a una longitud de onda de a) 600 nm, b) 680 nm y c) 750 nm para ensayos batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Leyenda: ( + ) último registro de absorbancia de Nativa I, (•◆•) Nativa I.1, (••••) Nativa I.2, (—◆—) CL USA 1, ( ■ ) última medición de CL USA 2, ( - ◆ - ) CL USA 2.1, ( - ■ - ) CL USA 2.2, ( - ▲ - ) CL USA 3, (—×—) EXP USA 1, (•*•••) EEUU 1, (—●—) EEUU2; la línea vertical corresponde al día en el que se cambió de medio y las curvas entrecortadas corresponden a las cepas replicadas.....	50
Figura 11. Monitoreo de crecimiento de algas mediante medición de absorbancia a una longitud de onda de a) 600 nm, b) 680 nm y c) 750 nm para ensayos batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Leyenda: la línea vertical corresponde al día en el que se cambió de medio a las réplicas I.1b1, I.1b2, I.2b1, I.2b2*, I.2b2*1 y la línea entrecortada corresponden al día en que se cambió de medio al resto de las cepas.....	53

- Figura 12. Cultivo de la cepa Nativa I.2.b2\* (400 mL) escogida para realizar la determinación de densidad celular y contenido de lípidos previo al montaje del fotobiorreactor. Fotografía: Geovanna Ruiz ..... 54
- Figura 13. Representación en 3D Autocad del fotobiorreactor tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas diseñado por Felipe Mosquera & Dr.-Ing. Ródney Peñafiel. .... 56
- Figura 14. Fotobiorreactor tubular de 10 L instalado. Iluminación provista por 5 lámparas de luz fría OSRAM de 20W y aireación provista por una bomba de aire con un flujo de a) 2.5 L min<sup>-1</sup> y b) 3 L min<sup>-1</sup>. Fotografía: Geovanna Ruiz ..... 58
- Figura 15. Bombeo de aire desde la parte inferior del fotobiorreactor con una bomba de aire. Movimiento de las microalgas desde la zona de oscuridad (interior) a la zona fótica (paredes laterales y superficie superior). La figura a) corresponde al flujo observado en el PBR instalado y la figura b) representa la mezcla ideal provocada por el flujo de aire. Representación 3D realizada en Autocad. .. 61
- Figura 16. Instalación y distribución de los dispersores en el fotobiorreactor. Las fotografías a) corresponden a la instalación de los dispersores en el PBR tubular y la figura b) corresponde a la vista superior en Autocad del PBR con la ubicación de los 3 dispersores..... 62
- Figura 17. Monitoreo del crecimiento de algas en el fotobiorreactor tubular de 10 L durante la fase exponencial mediante la medición de a) absorbancia y b) densidad de algas, SST (mg L<sup>-1</sup>). Leyenda: DO en la longitud de onda de (■) 600 nm, (▲) 680 nm y (◆) 750 nm; densidad de algas en mg L<sup>-1</sup> (●). ..... 65
- Figura 18. Monitoreo de crecimiento de algas en el fotobiorreactor tubular de 10 L mediante medición de absorbancia en longitud de onda de a) 600 nm, b) 680 nm y c) 750 nm, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El medio de cultivo se cambió regularmente (2 a 3 L) durante los primeros 110 días de funcionamiento del PBR tubular. Leyenda: (◆) absorbancia. La línea entrecortada corresponde a la fecha a partir de la cual se realizaron extracciones diarias de 200 mL de medio viejo y se reemplazo con el mismo volumen de medio con proteosa (día 116), la línea vertical corresponde al día en que se instalaron los dispersores (día 140) y las líneas punteadas a los días en que se regó el contenido del fotobiorreactor (días 153 y 184). ..... 67
- Figura 19. Monitoreo de a) densidad celular (g L<sup>-1</sup>) y b) contenido de lípidos (%w/w) con respecto al tiempo de funcionamiento del PBR tubular para el crecimiento de microalgas nativas. .... 69
- Figura 20. Monitoreo de los parámetros físico-químicos con respecto al tiempo de funcionamiento del fotobiorreactor tubular para el cultivo autotrófico de microalgas nativas. Leyenda: a) pH, b) conductividad (◆) antes y ( ) después de cambiar el medio de cultivo, c) temperatura y d) concentración de OD en el fotobiorreactor. .... 71
- Figura 21. Monitoreo de nutrientes con respecto al tiempo de funcionamiento del fotobiorreactor tubular para el cultivo autotrófico de microalgas nativas. Leyenda: (◆) concentración (ppm) de a) Amonio, b) Nitrato c) Fósforo total en el tiempo. .... 75
- Figura 22. Monitoreo del efecto de nutrientes en crecimiento de algas en bioensayos batch de 500 mL mediante medición de absorbancia en longitud de onda de a) 600 nm, b) 680 nm y c) 750 nm, con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con lámparas OSRAM de luz fluorescente blanca fría de 20 W y agitación continua de 50 rpm mediante un agitador orbital. Leyenda: (◆) Control, bioensayo con una concentración de fertilizante (■) 1 mL L<sup>-1</sup>, (▲) 2 mL L<sup>-1</sup>, (◆) 3 mL L<sup>-1</sup> ..... 79
- Figura 23. Fotografías de los bioensayos batch de 500 mL para evaluar el efecto del fertilizante en el contenido de lípidos de la microalga *Chlorella sp.* Los bioensayos se mantuvieron a 25°C, con ciclos

de 12 h de luz y 12 h de oscuridad con lámparas OSRAM de luz fluorescente blanca fría de 20 W, agitación continua a 50 rpm utilizando un agitador orbital en un tiempo de cultivo de 8 días.

Fotografía: Geovanna Ruiz ..... 80

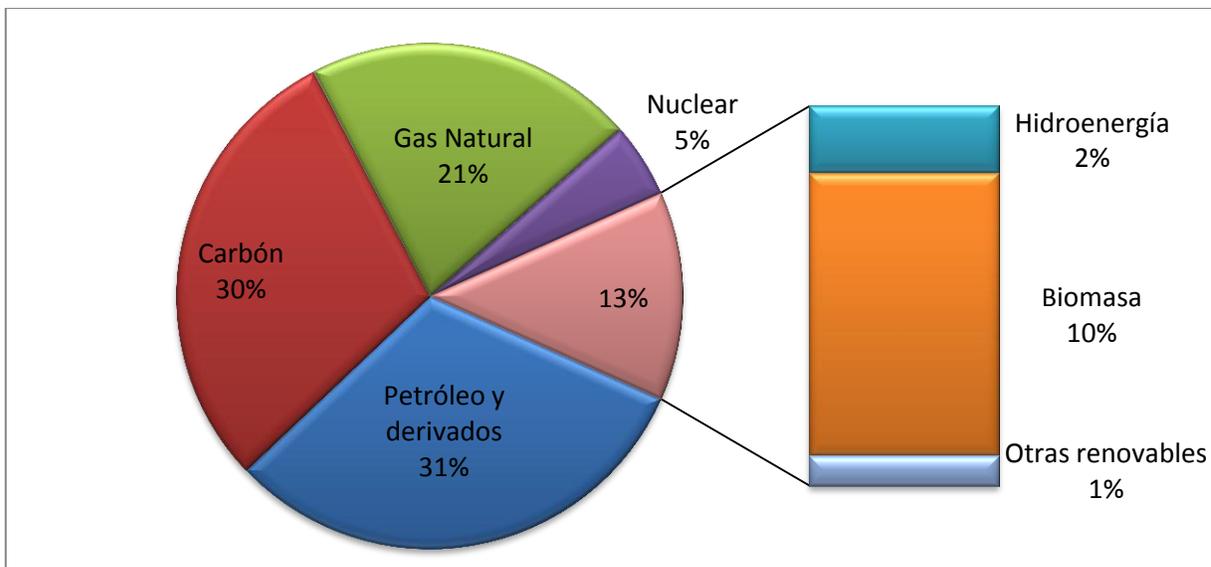
Figura 24. Evaluación de la densidad de algas ( $\text{g L}^{-1}$ ) y contenido de lípidos (%w/w) en los bioensayos con fertilizante. Leyenda: barras de línea entrecortada (densidad de algas) barras de línea continua (contenido de lípidos)..... 81

Figura 25. Evolución de la estructura del flujo en diferentes cortes transversales de los PBRs: (a) para un PBR espiral; (b) para un PBR tubular. Fuente: (L. B. Wu et al., 2009) ..... 89

## 1. Introducción

La revolución industrial del siglo XVIII y XIX, marcó un cambio importante en la economía mundial. Un crecimiento sostenido se produjo gracias al proceso de transformación social y tecnológica que inició en Gran Bretaña; y, fue el detonante para que la Organización de las Naciones Unidas (ONU) empiece a prestar mayor atención a las alteraciones generadas al medio ambiente y las repercusiones a la salud humana por parte de los gases emitidos durante los procesos productivos (Fernández, Montiel, Millán, & Badillo, 2012; Parra Narváez, 2011).

Con los avances tecnológicos, mejoró la calidad de vida y la población mundial se ha incrementado continuamente. Debido a ello, una mayor cantidad de fuentes de energía es necesaria para suplir la demanda energética. Durante varias décadas se ha dependido de combustibles fósiles (petróleo) como principal fuente de energía (McGinn et al., 2013). Sin embargo, este combustible es altamente contaminante y no renovable. Constituye una fuente importante de gases de efecto invernadero (GEI) como el dióxido de carbono y otros contaminantes atmosféricos locales y transfronterizos (Fernández et al., 2012; Parra Narváez, 2011). Con dichos antecedentes, la comunidad mundial ha empezado a tomar medidas de eficiencia energética, enfocándose en la optimización de la producción y consumo de energía. Y, cada vez más se está promoviendo la utilización de sistemas de energía amigables con el ambiente, en especial los renovables. La Figura 1 presenta la matriz energética global del 2012, se indican las principales fuentes de generación de energía en el mundo y el aporte de cada una.



**Figura 1.** Distribución global de la producción energética para el 2012. Fuente: (IEA, 2013)

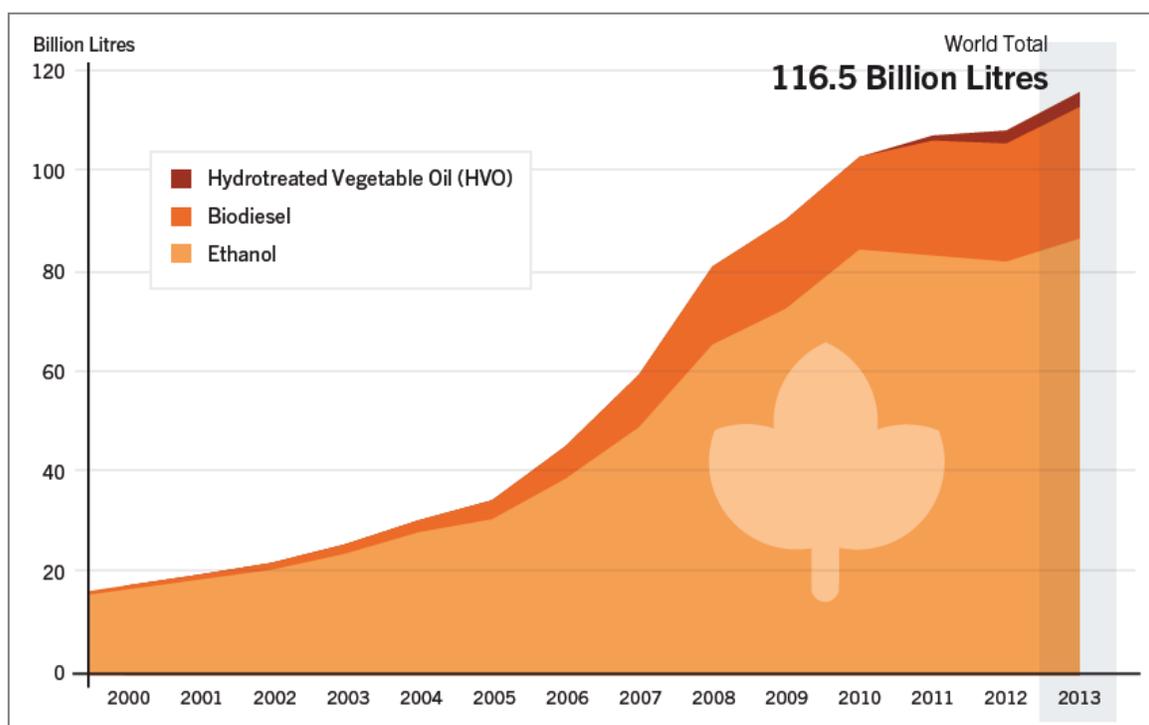
## **1.1. Energías renovables**

La Agencia Internacional de Energía (International Energy Agency, IEA) define a las energías renovables como las energías procedentes de procesos naturales (luz solar, viento, etc.) que se reponen a un ritmo mucho más rápido de lo que se consumen. Se consideran fuentes prácticamente inagotables respecto al tiempo de vida del hombre en el planeta, y cuyo aprovechamiento es viable (Fernández et al., 2012). Entre los tipos de energías renovables desarrollados se tiene a la energía solar, termal o fotovoltaica, geotérmica, eólica, biomasa, oceánica, entre otras (Dewulf & Van Langenhove, 2006). De las energías mencionadas, la fuente más prometedora para la reducción de los GEI, por su gradual reemplazo de los combustibles fósiles, es la biomasa (Mata et al., 2010). La biomasa o materia orgánica es la materia prima de los biocombustibles.

## **1.2. Biocombustibles**

Combustibles sólidos, líquidos o gaseosos potencialmente renovables que pueden ser usados en el sector de transporte, eléctrico y para la generación de calor (Brennan & Owende, 2010; Demirbas, 2008). De la oferta energética mundial, el 18% corresponde a energía renovable y de éste porcentaje el 10% de la producción mundial de energía se debe a la biomasa, convirtiendo a los biocombustibles en la cuarta mayor fuente de energía en el mundo (Ahmed et al., 2012). La producción global anual de biocombustibles ha incrementado de 7.7 billones de litros a alrededor de 116.6 billones de litros (Brower et al., 2014; Mata et al., 2010) en la última década. La Figura 2 muestra la evolución de la producción mundial de biocombustibles en el siglo XXI. Para el 2013, la producción de bioetanol aumento en 4.6 billones de litros, alcanzando un total de 87.2 billones de litros, el biodiesel aumento en 2.7

billones para dar un total de 26.3 billones de litros de combustible y el aceite vegetal tratado con hidrógeno (Hydrotreated Vegetable Oil, HVO) subió 0.4 billones de litros para llegar a la producción de 3 billones de litros al final del año (Brower et al., 2014). Los dos primeros tipos de biocombustibles, bioetanol y biodiesel, se pueden clasificar en biocombustibles de 1<sup>ra</sup>, 2<sup>da</sup> y 3<sup>ra</sup> generación (Álvarez, 2009). Los de primera generación se definen como los biocombustibles producidos a partir de plantas tradicionales (biomasa de alimento) como caña de azúcar, trigo, maíz, palma africana, etc.; los de segunda generación son aquellos que utilizan residuos agroindustriales y desechos; y, los de tercera generación son aquellos que utilizan nuevos productos de rápido crecimiento (microorganismos, algas) para su producción (FAO, 2008). Los principales biocombustibles actualmente producidos son el biodiesel y bioetanol; estos biocombustibles líquidos cubren un 2.4 % de la demanda global del sector de transporte (Brower et al., 2014; IEA, 2013).



**Figura 2.** Producción global de (■) etanol, (■) biodiesel y (■) aceite vegetal hidrogenado, periodo 2000-2013. Fuente: REN21, 2014. Renewables 2014 Global Status Report (Paris: REN 21 Secretariat).

### **1.2.1. Situación de los biocombustibles a nivel mundial y en el Ecuador**

Más países han iniciado el desarrollo de biocombustibles, principalmente como una opción de reemplazo de los combustibles fósiles en el sector del transporte. La Figura 3 muestra un mapa mundial que resalta los países que producen biocombustibles en el mundo. Actualmente, 56 países se encuentran investigando e implementando tecnologías para la producción de biocombustibles, en especial bioetanol y biodiesel. Quienes lideran el mercado, son países desarrollados como Estados Unidos, Alemania, China, Brasil, etc. En América Latina, la mayoría de países ya producen biocombustibles a gran escala, excepto Venezuela, Ecuador, Chile y Paraguay.

En Ecuador existen pocas inversiones y estudios; sin embargo, se consideran algunos avances a nivel legal. El Decreto Ejecutivo N°2332 en el Registro Oficial 482 (2004) declaró de interés nacional la producción, comercialización y uso de los biocombustibles. Además, según el Decreto Ejecutivo No. 146 (2007), se crea el Consejo Nacional de Biocombustibles, con el objetivo de definir políticas y aprobar planes, programas y proyectos relacionados a los biocombustibles, incentivando su producción. Finalmente, la Constitución Política del Ecuador en el Artículo 413 indica que el estado debe promover la eficiencia energética a través del uso de nuevas tecnologías, siempre y cuando estas no interfieran con la soberanía alimentaria del país.



**Figura 3.** Mapa mundial de producción de bioenergía (biocombustibles). Fuente: REN21 Renewables Interactive Map en <http://www.map.ren21.net/#fr-FR/search/by-technology/8,11,29,122>

### **1.2.2. Producción de Biocombustibles en el Ecuador**

En el Ecuador, se produce a pequeña escala bioetanol (etanol anhidro) a partir de la caña de azúcar. Se estima que se cosechan aproximadamente 130 588 ha de caña de azúcar en todo el país de las cuales 81 000 ha se destinan para la producción de azúcar y etanol (Castillo, 2013). La incorporación de 5% de etanol anhidro a naftas de producción nacional, es una alternativa que ayuda a reducir el actual déficit de octanaje en gasolinas, reemplazar las importaciones de naftas de alto octano y reducir las emisiones de GEI del parque automotor nacional (Ministerio de Energía y Minas, 2008).

En el caso del biodiesel, la materia prima utilizada para su producción en el Ecuador es la palma africana, se estima actualmente una producción de 350 000 TM. Un área de 207 285 ha está concedida al cultivo de palma africana en el Ecuador. La principal provincia productora es Esmeraldas que cuenta con una superficie de 79 719 ha de cultivo. Cabe mencionar, que para el 2013 se implementó el mandato de mezclar el biodiesel en un 5% con el Diesel 2 y se pretende aumentar hasta un 10% en un futuro (Brower et al., 2014).

### **1.3. Biodiesel**

El biodiesel es un biocombustible líquido compuesto de alquil-ésteres de alcoholes de cadena corta como etanol y metanol, con ácidos grasos de cadena larga producido a partir de aceites vegetales y grasas animales (Chisti, 2007; Fernández et al., 2012; Mata et al., 2010). El biodiesel puede ser utilizado en automóviles con motores a diesel instalados así como en aplicaciones de energía y calor estacionario (Brower et al., 2014). Sus propiedades son similares a las del diesel en cuanto a calor de combustión y densidad, lo cual permite su mezcla (Wahlen et al., 2013). La Tabla 1 presenta un cuadro comparativo de las propiedades

del bioetanol y biodiesel frente a la gasolina y diesel, respectivamente; siendo mejores los valores relativos del biodiesel en comparación con el etanol.

**Tabla 1.** Comparación de propiedades de los combustibles fósiles vs biocombustibles. Fuente: Elaboración propia a partir de (Brower et al., 2014)

Propiedad del combustible	Unidad	1 L de combustible/biocombustible			
		Gasolina	Etanol	Diesel	Biodiesel
Calor de combustión	MJ kg <sup>-1</sup>	47.0	29.7	45	40
	MJ L <sup>-1</sup>	35.2	23.4	37.3	35.2
Densidad	kg m <sup>-3</sup>	750	790	830	880

Nota: Valores pueden variar dependiendo del combustible y temperatura.  
Alrededor de 1.5 L de etanol se necesitan para igualar 1 L de gasolina.

Las materias primas más comunes para la fabricación del biodiesel son: los aceites de girasol, de coco, de palma africana, *Jatropha curcas* (piñon), entre otros. La Tabla 2 indica una comparación entre algunas de las fuentes de materias primas mencionadas en cuestión de rendimiento, productividad de biodiesel por área al año y la superficie requerida para su cultivo.

**Tabla 2.** Comparación de distintas fuentes de materia prima para la producción de biodiesel. Fuente: (Fernández et al., 2012)

Organismo	Rendimiento de aceite (L/ha)	Productividad de Biodiesel (L/ha/año)	Superficie equivalente requerida (ha x 10 <sup>6</sup> )
Palma <sup>a</sup>	2400	5950	3.972
<i>Jatropha</i> <sup>a</sup>	1300	1892	12.490
Colza <sup>a</sup>	1100	1190	19.859
Girasol <sup>a</sup>	690	952	24.823
Soja <sup>a</sup>	400	446	52.986
Microalga <sup>b</sup>	18750	12000	1.969
Microalga <sup>c</sup>	58760	-	-

<sup>a</sup> (Schenk et al., 2008).

<sup>b</sup> *Phaeodactylum tricorutum*, 20% aceite (% peso) en biomasa a 5 g lípidos/m<sup>2</sup> día.

<sup>c</sup> 30% aceite (% peso) en biomasa (Chisti, 2007).

El biodiesel es una alternativa renovable que puede reducir las emisiones de GEI; sin embargo, el biodiesel a partir de cultivos de plantas oleaginosas, aceite de cocina usado y algunas otras fuentes no puede cubrir la demanda existente de combustible. Además, debido a que los aceites vegetales también son de consumo humano, la producción de biodiesel a partir de estos puede provocar competencia e incrementar el precio tanto de los alimentos como del mismo biodiesel (Mata et al., 2010); por lo mismo, se buscan alternativas que no utilicen biomasa de alimento (biocombustibles de 3<sup>era</sup> generación).

#### **1.4. Microalgas**

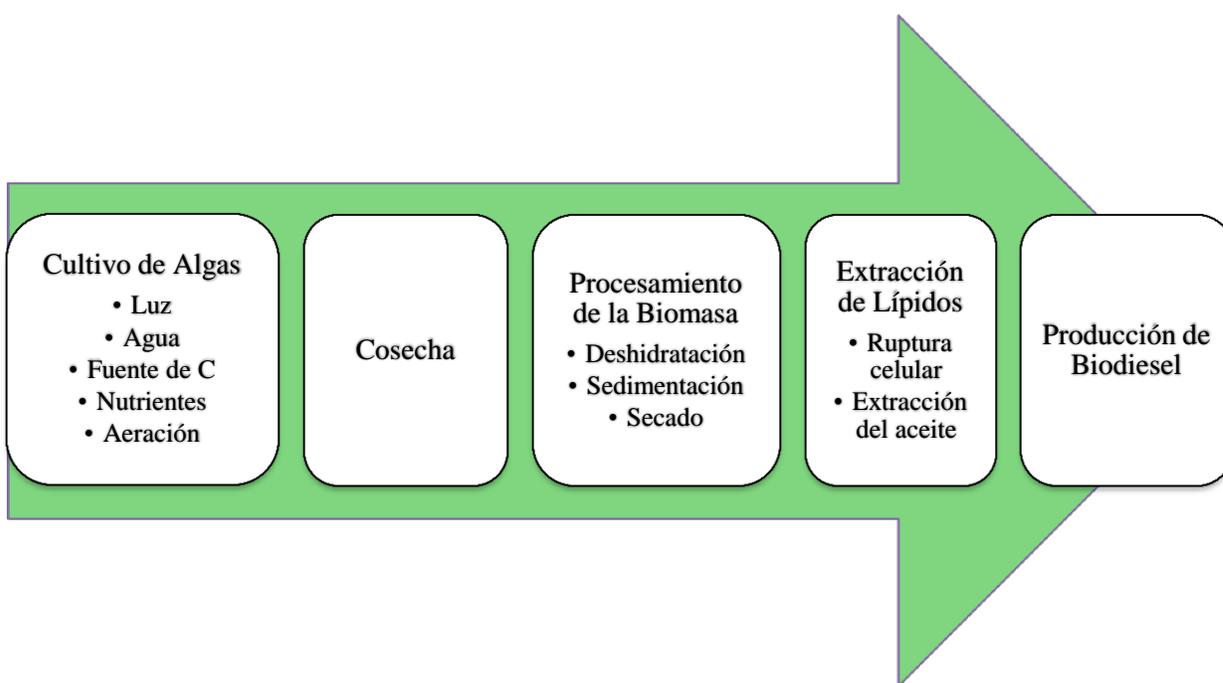
Las microalgas son microorganismos (2-200 $\mu$ m) fotosintéticos procariotas (Cyanobacterias) y eucariotas (algas verdes) que pueden crecer rápidamente y vivir en distintas condiciones de estrés (Fernández et al., 2012; Mata et al., 2010). Existen alrededor de 50 000 especies de microalgas de las cuales 30 000 se han estudiado y analizado y tan sólo 30 especies (marinas o de agua dulce) se han reportado de que podrían ser utilizadas para la extracción de biocombustibles por su capacidad de almacenar lípidos en sus células (Abdelaziz, Leite, & Hallenbeck, 2013; Frac, Jezierska-tys, & Tys, 2010; Mata et al., 2010). Generalmente duplican su biomasa en 24 horas, la duración del crecimiento exponencial es corto, generalmente de 3,5 h (Chu, 2012). Los primeros cultivos estudiados fueron los del cultivo de la cepa de microalga *Chlorella* en Japón por Nihon Chlorella en 1960 (Mata et al., 2010). Dependiendo de la especie, las microalgas producen diferentes tipos de lípidos, hidrocarburos y otros aceites complejos y en diferentes cantidades (Chu, 2012). La Tabla 3 presenta un cuadro comparativo de distintas especies de microalga *Chlorella* en cuanto a su contenido (% w/w) y producción ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) de lípidos y productividad de la biomasa ( $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ).

**Tabla 3.** Contenido de lípidos y productividades de diferentes cepas de microalga *Chlorella*.  
Fuente: Elaboración propia a partir de (Mata et al., 2010)

Especie	Contenido de lípidos (% w/w)	Producción de lípidos (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Productividad de la biomasa (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0 – 63.0	10.3 – 50.0	0.036 – 0.041
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6 – 57.8	1214	2.00 – 7.70
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0 – 22.0	44.7	0.23 – 1.47
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0 – 58.0	11.2 – 40.0	0.02 – 0.20
<i>Chlorella sp.</i>	10.0 – 48.0	42.1	0.02 – 2.5
<i>Chlorella</i>	18.0 – 57.0	18.7	-

#### 1.4.1. Uso de microalgas para la producción de biodiesel

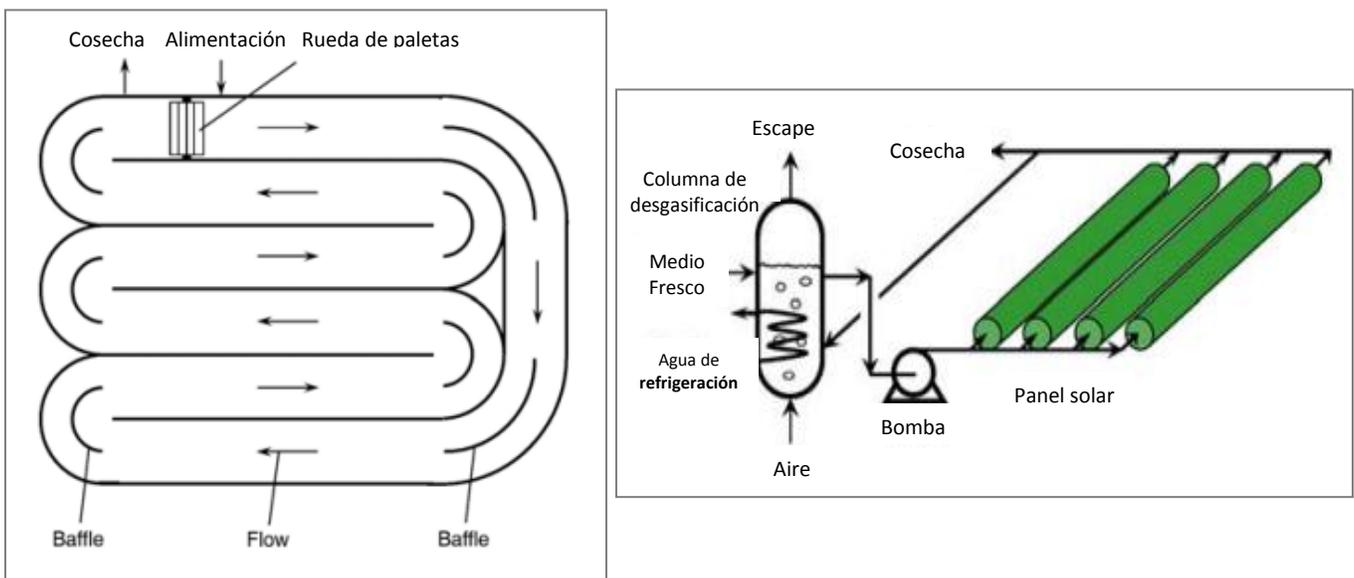
El uso de microalgas para la producción de biodiesel es una opción prometedora gracias a la eficiencia fotosintética que poseen en comparación con otras materias primas, lo cual les permite acumular entre el 20 y el 80% de triglicéridos (o triacilglicerolos, TAG) de la biomasa (Fernández et al., 2012). Las microalgas tienen una alta productividad de biomasa, tasa de crecimiento más rápido en comparación con algunas plantas, mayor fijación de CO<sub>2</sub> y producción de O<sub>2</sub> (Gouveia & Oliveira, 2009). Además, pueden crecer en casi todas partes y requerir hasta 49 o 132 veces menos superficie de tierra que otros cultivos. La producción de biodiesel a partir de algas es un proceso que requiere previamente la identificación de las condiciones adecuadas (luz, agua, nutrientes, fuente de carbono, etc.) para optimizar el contenido de lípidos. La Figura 4 muestra un diagrama general de los pasos de la producción de biodiesel a partir de microalgas.



**Figura 4.** Descripción general del proceso de obtención de biodiesel a partir de microalgas.  
Fuente: Elaboración propia a partir de (Mata et al., 2010)

#### **1.4.2. Fotobiorreactores para la producción de biodiesel a partir de microalgas**

El crecimiento de microalgas a gran escala se lo puede realizar a través de su cultivo en sistemas abiertos o cerrados (Tschirley, 2009). Los sistemas abiertos son simples. Generalmente, son lagunas al aire libre poco profundas no agitadas o agitadas por medio de turbinas o paletas (Frac et al., 2010; Gouveia, 2011; Tschirley, 2009). Tienen bajos costos de instalación y operación. Sin embargo, en estos sistemas el cultivo se encuentra en contacto directo con la atmósfera y es susceptible a contaminación; tienen menores tasas de producción de lípidos y limitada transferencia de CO<sub>2</sub> al cultivo (Gouveia & Oliveira, 2009; Gouveia, 2011; Yanqun Li et al., 2008). Los sistemas cerrados, en cambio, son sistemas más complejos y caros. Los más utilizados son los fotobiorreactores de columna vertical, fotobiorreactores cilíndricos y fotobiorreactores planos (paneltype) (Gouveia, 2011; Molina Grima et al., 1999; Salih et al., 2012). Las ventajas de un fotobiorreactor tubular además de evitar la contaminación del cultivo, son la capacidad de mezcla que se puede alcanzar (sin dañar las paredes celulares de las microalgas), alta productividad, uso moderado de agua, eliminación de CO<sub>2</sub>, entre otras (Gouveia & Oliveira, 2009). La Figura 5 muestra un ejemplo de los dos principales tipos de reactores para el cultivo de microalgas, lagos abiertos (open ponds) y fotobiorreactores (photobioreactor, PBR). Los sistemas cerrados, en especial fotobiorreactores de columna vertical, se recomiendan debido al incremento de la biomasa en los mismos. Además que se pueden controlar con mayor facilidad parámetros como iluminación, pH, OD, cantidad de C inorgánico (CO<sub>2</sub>), etc. (Chisti, 2007; Molina et al., 2001; Molina Grima et al., 1999).



**Figura 5.** Tipo de sistemas de cultivo de microalgas. Leyenda: A la izquierda se presenta un sistema abierto (estanque de rodadura) y a la derecha un sistema cerrado (PBR). Fuente: (Chisti, 2007)

## 2. Justificación

Durante la quema de combustibles fósiles se producen gases de efecto invernadero (GEI) que contribuyen al cambio climático y generan impactos al medio ambiente. Adicionalmente, la creciente demanda de combustibles para el sector energético y de transporte, han provocado un alto interés del desarrollo de energías renovables. El Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) en su reciente informe menciona que para el 2010 las principales emisiones de GEI se atribuyen a la generación de energía con un 35%, seguido por el sector industrial con el 30% y el sector del transporte tiene una aportación del 23%. Este hecho es preocupante ya el sector del transporte ha incrementado sus emisiones a un ritmo mucho mayor que cualquier otra energía (IPCC, 2014).

El balance energético en el Ecuador para el 2011 indica que el 90% de la fuente de energía en el país es el petróleo y aproximadamente el 50% de ese petróleo es destinado al sector del transporte (CONELEC, 2011). Dentro del consumo de energía por fuente, se define un 25% a gasolinas, y un 32% a Diesel oil. Una de las alternativas planteadas son los biocombustibles de tercera generación, a partir de biomasa. Las principales ventajas de esta fuente de energía renovable son las mínimas áreas de cultivo requeridas, asimilación de CO<sub>2</sub> durante su proceso de fotosíntesis, y, el biocombustible elaborado a partir de las microalgas posee propiedades lubricantes y densidades similares al diesel convencional, permitiendo su sustitución. La producción de biocombustibles a partir de microalgas tiene un gran potencial como fuente de energía sostenible. Sin embargo, es necesario mejorar la productividad del contenido de lípidos y generar las cantidades necesarias de biocombustibles para poder reemplazar a los combustibles convencionales.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo general

El objetivo principal de este estudio fue instalar y monitorear un fotobiorreactor tubular con flujo de aire ascendente de 10 L para el crecimiento autotrófico de microalgas utilizando una especie de microalga nativa verde.

#### 3.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este estudio fueron:

- Cultivar microalgas de las cepas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sp.* mediante un proceso de fortalecimiento, crecimiento y acondicionamiento y escoger la cepa más fuerte para montar el fotobiorreactor tubular.
- Instalar y monitorear un fotobiorreactor (*photobioreactor*, PBR) tubular para el crecimiento de microalgas.
- Evaluar el efecto de diferentes condiciones de cultivo y de operación del fotobiorreactor en la tasa de producción de lípidos de las microalgas nativas

## 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%), bicarbonato de sodio (99,7-103%), cloruro de amonio (90%), metanol (99,5%) y cloroformo (99,9%) fueron adquiridos en los Laboratorios Químicos H.V.O. (Quito, Ecuador). Proteosa peptona (83%) fue obtenida en DIPCO (Quito, Ecuador). Los fertilizantes NUTRI-LEAF 20-20-20 (Miller Chemical & Fertilizer Corp., Hannover U.S.A.) y Organic Fruit (United Agricultural Services of América, Agrorganic, Quito, Ecuador) se adquirieron en Kywi Supercentro Ferretero (Quito, Ecuador).

### 4.2. Microalgas

La principal cepa utilizada en este estudio fue adquirida de una cepa madre de *Chlorella sp.* perteneciente a la Escuela de las Fuerzas Armadas ESPE. Esta cepa se la refiere en el texto como Nativa. La cepa *Chlorella Protothecoides* (o *Chlorella vulgaris*) fue importada de Estados Unidos de un cultivo madre de la Universidad de Texas en Austin. Esta cepa fue dividida en tres cultivos que fueron CL USA, EXP USA y EEUU. Todas las cepas fueron cultivadas en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito (LIA-USFQ, M007).

### 4.3 Medio de Cultivo

Durante los primeros 6 meses del estudio, se utilizaron dos medios de cultivo para el crecimiento de las algas. El medio I o medio de proteosa fue preparado de acuerdo a las

recomendaciones de la Universidad de Texas en Austin para el cultivo de *Chlorella vulgaris*. El medio II, medio con fertilizante, utilizado para acelerar el crecimiento de las microalgas y recuperarlas cuando no se encontraban saludables, se basó en el medio de cultivo Sueoka's con contenido alto de sales. En el fotobiorreactor se utilizó únicamente el medio de proteosa.

#### 4.3.1. Medio de Proteosa

El medio de proteosa se elaboró en base al medio Bristol añadiendo 1 g L<sup>-1</sup> de proteosa peptona (UTEX, n.d.-b) y 0.1 g L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> como fuente de carbono (Dávila Gavilanes, 2013). El medio Bristol tiene la siguiente composición en (g L<sup>-1</sup>): NaNO<sub>3</sub> (0,25), CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (0,025), MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O (0,075), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,075), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,175) y NaCl (0,025) (UTEX, n.d.-a).

#### 4.3.2. Medio con Fertilizante

El medio con fertilizante fue preparado con 5 mL L<sup>-1</sup> de una solución de sales o solución de Beijerinck's (Sueoka, 1960), 5 mL L<sup>-1</sup> de una solución de fosfato, 1 mL L<sup>-1</sup> de una solución de elementos traza, 1 mL L<sup>-1</sup> de una solución de bicarbonato de sodio y 1 g L<sup>-1</sup> de fertilizante NUTRI-LEAF 20-20-20. La composición de la solución de sales en (g L<sup>-1</sup>) consistió en: NH<sub>4</sub>Cl (100), MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O (4) y CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (2). La composición de la solución de fosfato en (g L<sup>-1</sup>) fue: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (288) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (144) (Sueoka, 1960). La solución de bicarbonato de sodio se preparó con NaHCO<sub>3</sub> en una concentración de 8%. La solución de elementos traza en (mg L<sup>-1</sup>) estuvo compuesta de: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(50), FeCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O (2.000), ZnCl<sub>2</sub> (50), MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O (50), (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>\*4H<sub>2</sub>O (50), AlCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O (90), CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O (2.000), NiCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O (50), CuCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (30), NaSeO<sub>3</sub>\*5H<sub>2</sub>O (100), EDTA (1.000), resazurin (200) y 1 mL L<sup>-1</sup> HCl 36%. La composición del fertilizante NUTRI-LEAF 20-20-20 (Miller Chemical

& Fertilizer Corp., Hanover, U.S.A) en (%) es de:  $\text{NO}_3^-$  (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) (Dávila Gavilanes, 2013).

#### **4.4. Crecimiento de microalgas**

El crecimiento de las microalgas *Chlorella vulgaris* en los cultivos CL USA, EXP USA y EEUU fue monitoreado durante los meses de Enero a Mayo 2013. El crecimiento de las microalgas la cepa Nativa de *Chlorella sp.*, para el montaje del PBR tubular, fue realizado durante los meses de Agosto a Diciembre 2013. Los cultivos se realizaron en matraces erlenmeyer de 500 y 1000 mL bajo condiciones batch. Las dos cepas fueron cultivadas en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito (LIA-USFQ, M007) en un sitio acondicionado a 25°C e iluminado con luz fluorescente blanca fría mediante tres lámparas OSRAM de 20 W con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad controlado por un temporizador Heavy Duty Timer (Intermatic, Illinois, U.S.A). En base a recomendaciones de Dávila (2013) se realizó el cambio de medio a las microalgas semanalmente y se agitaron manualmente a diario para evitar sedimentación y problemas de reducción de masa (Dávila Gavilanes, 2013). Los matraces erlenmeyer fueron cubiertos con tapas de esponja de silicón para evitar la contaminación de agentes externos y, a la vez que permitir la oxigenación para el crecimiento de las microalgas. Una vez obtenido un volumen mayor a 7 L de microalgas, se procedió al montaje del fotobiorreactor como se explica en la sección 4.5.

La población de algas fue evaluada a través de monitoreos diarios del crecimiento de microalgas mediante absorbancia. Las extracciones de 1 a 4 mL del cultivo en agitación

fueron realizadas bajo condiciones asépticas. En el caso de los bioensayos batch la absorbancia fue medida directamente y conforme la densidad de algas fue aumentando, se realizó una dilución 1:5. En el caso del monitoreo del fotobiorreactor, siempre se realizaron diluciones 1:5. La absorbancia se determinó utilizando un espectrofotómetro (Spectronic 20 D+, New York, U.S.A) en tres diferentes longitudes de onda: 600 y 680 nm (para medir el color verde) y 750 nm (para medir la masa celular). El espectrofotómetro fue encerando utilizando un medio de proteosa puro. Las curvas de crecimiento de algas fueron elaboradas graficando las mediciones de absorbancia con respecto al tiempo.

La densidad de biomasa de algas se obtuvo 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 y fue expresado en porcentaje en peso (% w/w). Los procedimientos realizados para cada uno de los dos experimentos se describen en la sección 4.6.

#### **4.5. Montaje del fotobiorreactor tubular**

Las condiciones adecuadas para la instalación del fotobiorreactor tubular se establecieron previamente con los ensayos semi-batch realizados por Dávila y Ochoa-Herrera (2013). El fotobiorreactor se instaló en enero 27 de 2014, con la microalga *Chlorella sp*, cepa Nativa. La fuente de carbono fue provista con bicarbonato de sodio en una concentración de  $0,10 \text{ g L}^{-1}$  incluida en el medio cultivo de proteosa. El suministro de luz se proporcionó con la instalación de cinco lámparas de luz fluorescente blanca fría de 20 W OSRAM con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad controlados con un temporizador Heavy Duty Timer. El volumen de algas inicial para la instalación del fotobiorreactor fue de 7,2 L. Una bomba de

aire de  $3 \text{ L min}^{-1}$  fue instalada en la parte inferior del fotobiorreactor para asegurar una mezcla completa. En base a las mediciones de absorbancia y de la tasa de crecimiento de las microalgas en el fotobiorreactor, se estableció un cambio de medio de cultivo diario de 300 mL. Para el monitoreo del fotobiorreactor se realizaron mediciones de parámetros físicos y químicos así como también determinaciones de la biomasa de algas y del contenido de lípidos.

## **4.6. Métodos analíticos para el monitoreo de algas**

### **4.6.1. Medición de la densidad de biomasa de algas**

La densidad o concentración de la biomasa generada por el crecimiento de las microalgas se determinó mediante la separación de las microalgas del medio de cultivo. Para ello, se secaron las microalgas aplicando el método recomendado en el estudio para desarrollo del crecimiento sostenible de microalgas para biocombustibles en Ecuador realizado por Sarah Dischinger y utilizado también por Ana Dávila en su estudio (Dávila Gavilanes, 2013; Dischinger, 2012).

Primero se extrajo un volumen de 100 mL de cultivo del fotobiorreactor y se transfirió a tubos falcon de 50 mL. Este volumen fue centrifugado en una centrífuga ICE Clinical Centrifuge (International Equipment Company, Massachusetts, U.S.A) del Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito durante 10 minutos a 5.000 rpm, para sedimentar las microalgas al fondo de los tubos. A continuación, se retiró todo el sobrenadante con una pipeta automática. Las microalgas sedimentadas fueron secadas en los tubos falcon de 50 mL abiertos a  $105^{\circ}\text{C}$  en un horno GC-Series Lab Ovens (Quincy Lab. Inc., Chicago, U.S.A) durante 8 horas. La concentración de biomasa, expresada en  $\text{g L}^{-1}$  se determinó en función del peso total de la biomasa y del volumen final utilizando la ecuación a continuación:

$$d_c = \frac{Tf50_{bs} - Tf50_v}{V_f} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde:

$d_c$  = Densidad celular ( $g L^{-1}$ )

$Tf50_{bs}$  = Tubo falcon de 50 mL con biomasa seca (g)

$Tf50_v$  = Tubo falcon de 50 mL vacío (g)

$V_f$  = Volumen Final (L)

#### 4.6.2. Medición del porcentaje de lípidos

La medición del porcentaje de lípidos se realizó mediante el método de extracción de lípidos a partir de la biomasa seca presentado en el estudio de Folch y colaboradores en el que se estandarizó un método simple para el aislamiento y purificación de los lípidos totales en tejidos animales (Folch et al., 1956). La biomasa seca se molió en un mortero de cerámica para romper las paredes celulares y obtener un polvo fino. La biomasa molida se colocó en un tubo falcon de 15 mL, previamente pesado. A continuación, se pesaron estos tubos con la biomasa molida y se añadieron 2 mL de cloroformo y 1 mL de metanol. El contenido de los tubos fue mezclado durante 30 segundos en un vórtex Vortexer 59A (Denville Scientific Inc., Edison, U.S.A) para permitir el contacto de los solventes orgánicos con las microalgas. Posteriormente, los tubos fueron colocados en una centrífuga K Centrifuge (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 añadió 5 mL de agua destilada a este tubo. Se llevó el tubo al vórtex durante 30 segundos y a continuación fueron centrifugados empleando la centrífuga K Centrifuge durante 10 minutos a 3.000 rpm.

Después del segundo proceso de centrifugación 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 oscuro o amarillento), separadas en función de las densidades de cada fase. Este proceso se repitió con la biomasa sedimentada resultante de la primera centrifugación hasta obtener un sobrenadante claro. La fase compuesta de cloroformo y lípidos fue transferida a tubos de cultivo de cristal de 10 mL. Finalmente, el líquido obtenido se sometió a un proceso de evaporación dentro de una sorbona de extracción de gases por una semana. Una vez evaporado el cloroformo, se pesó el tubo de cultivo y con el peso del tubo de cultivo vacío, se calculó el peso de los lípidos secos. Las ecuaciones empleadas para obtener el porcentaje de lípidos se detallan a continuación:

$$Ls = Tc_l - Tc_v \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$B_s = Tf15_b - Tf15_v \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\text{Contenido de lípidos \% (w/w)} = \frac{Ls}{B_s} * 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

$Ls$  = Lípidos secos (g)

$Tc_l$  = Tubo de cultivo con lípidos (g)

$Tc_v$  = Tubo de cultivo vacío (g)

$B_s$  = Biomasa seca (g)

$Tf15_b$  = Tubo falcon 15 mL con biomasa (g)

$Tf15_v$  = Tubo falcon 15 mL vacío (g)

#### **4.7. Evaluación del efecto de fertilizante**

El efecto del fertilizante en la producción de lípidos fue evaluado en bioensayos batch. Los bioensayos de cultivo de microalgas se realizaron utilizando la cepa Nativa en matraces erlenmeyer de 1000 mL con el medio proteosa y diferentes concentraciones de fertilizante en un volumen fijo de 500 mL. Los bioensayos fueron sometidos a agitación continua utilizando un agitador orbital (Shaker, Lab-Line Instruments, U.S.A) a una velocidad de 50 rpm. 3 bioensayos fueron realizados por duplicado añadiendo al medio de cultivo 1, 2 y 3 mL de fertilizante líquido por L de medio de cultivo, respectivamente. Bioensayos control fueron realizados en paralelo en ausencia de fertilizante. El crecimiento de las microalgas en todos los bioensayos se evaluó a través de la medición de la DO, concentración de biomasa y el porcentaje de lípidos extraídos.

#### **4.8. Métodos analíticos para parámetros físico-químicos**

##### **4.8.1. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno**

La determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) total se realizó mediante un método colorimétrico de acuerdo al método de referencia SM 5220 B (APHA, AWWA, & WEF, 2012). En este proceso se empleó una solución de digestión de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ )  $10.22 \text{ g L}^{-1}$  con ácido sulfúrico concentrado, y una solución de ácido sulfúrico concentrado con nitrato de plata en una relación en peso 6:1 de  $\text{g AgNO}_3$  por  $\text{kg H}_2\text{SO}_4$ . Una curva de calibración con estándares de 50, 100, 250, 500 y 750  $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  elaborados a partir de una solución madre de KHP (ftalato ácido de potasio) de  $1000 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  fue realizada. La muestra fue preparada añadiendo 2.5 mL de muestra, 1.5 mL de solución de digestión y 3.5 mL de ácido sulfúrico con nitrato de plata en tubos de digestión. Luego, se digirió la muestra a

150°C por dos horas en un horno GC-Series Lab Ovens. Finalmente, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro Spectronic 20D+ a una longitud de onda de 600 nm.

#### **4.8.2. Amonio**

El método de referencia empleado para medir amonio fue SM 4500-NH<sub>3</sub> D (APHA et al., 2012) empleando un electrodo selectivo de amonio Orion (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) y un electrodo de referencia Orion (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA). Una curva de calibración con estándares de 10, 25, 50, 75 y 100 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup> preparados a partir de un solución madre de 1000 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup> como cloruro de amonio fue elaborada. 10 mL de cada solución estándar fueron mezclados con 1 mL de una solución de ajuste iónico (ISA, por sus siglas en inglés) previamente preparada y se midió el potencial. La solución ISA consistió en 0.25 M de acetato de magnesio y 0.5 M de ácido acético. Los valores de potencial expresados en mV fueron graficados en función de la concentración de amonio de acuerdo a la ley de Beer y se obtuvo un coeficiente de correlación (RSQ) de 0.99. La muestra fue analizada empleando 10 mL de muestra mezclada con 1 mL de ISA y se registró el potencial en mV. La concentración de amonio fue calculada en base a la curva de calibración descrita.

#### **4.8.3. Nitratos**

El método de referencia para medir nitrato fue SM 4500 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> D (APHA et al., 2012) empleando un electrodo selectivo de nitrato Orion (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA). Una curva de calibración con estándares de 10, 25, 50, 75 y 100 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> preparados a partir de una solución madre de 1000 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> como nitrato de sodio fue realizada. 10 mL de cada estándar fue mezclado con 0.2 mL de una solución de ajuste iónico (ISA No. 930711) (Thermo Scientific, Beverly, MA, USA) y se determinó el potencial expresado en mV. Los

potenciales se graficaron en función de la concentración de nitrato de acuerdo a la ley de Beer y se obtuvo un RSQ de 0.99. La muestra fue analizada empleando 10 mL de muestra mezclada con 0.2 mL de ISA y se registró el potencial en mV. La concentración de nitrato fue calculada en base a la curva de calibración obtenida.

#### **4.8.4. Fosfatos**

La medición de fosfatos se realizó usando como referencia el método SM 4500-P B (APHA et al., 2012) para la digestión de las muestras y posteriormente se utiliza el método SM 4500-P C (APHA et al., 2012) para la evaluación colorimétrica.

**Método de digestión por persulfato.** 60 mL de muestra fueron filtrados utilizando papel filtro y filtro whatman para obtener el sobrenadante libre de algas. A 50 mL del filtrado se agregó 1 gota del indicador de pH fenolftaleína, se neutralizó con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y se añadió 0.5 g de persulfato de potasio. A continuación, la solución fue hervida en una plancha de calentamiento CORNING PC-620D (NOVACHEM, Ecuador) por aproximadamente 1 hora, o hasta obtener 10 mL de solución. Una vez enfriada, se agregó agua destilada hasta alcanzar 30 mL, se colocó 1 gota de fenolftaleína y se neutralizó con NaOH. Finalmente, se diluyó con agua destilada hasta alcanzar 100 mL de solución.

**Método colorimétrico con ácido vanado-molibdo fosfórico.** 2.5 mL del filtrado fueron colocados en un balón de 25 mL, se agregó 5 mL del reactivo vanadato-molibdato y se aforó hasta la marca. A los 10 minutos se midió la absorbancia por triplicado. Una curva de calibración con estándares de 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 mg de  $\text{P-PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$  preparados a partir de una solución madre de 50 mg de  $\text{P-PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$  como fosfato monobásico de potasio fue realizada. La cantidad de fósforo presente, se obtuvo mediante la ecuación:

$$P = \frac{M}{V} \times 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde:

$P$  = Concentración de fósforo ( $\text{mg P L}^{-1}$ )

$M$  = masa de P, en 25mL de volumen final (mg)

$V$  = mL de muestra

#### 4.8.5. Conductividad

La conductividad se midió in situ de acuerdo al método de referencia SM 2510 B (APHA et al., 2012) empleando un multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star (ThermoScientific, Beverly, MA, USA) y se expresó en  $\mu\text{S/cm}$ . El electrodo fue calibrado utilizando un estándar de conductividad de 1413  $\mu\text{S/cm}$ .

#### 4.8.6. Oxígeno disuelto (OD)

El oxígeno disuelto se midió in situ de acuerdo al método de referencia SM 4500 O G (APHA et al., 2012) empleando un multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star y se expresó en  $\text{mg L}^{-1}$ .

#### 4.8.7. Potencial de hidrógeno (pH)

El pH se midió in situ de acuerdo al método de referencia SM 4500-H+ B (APHA et al., 2012) empleando un multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star y se expresó en unidades de pH. El electrodo fue calibrado empleando soluciones buffer de pH 4, 7 y 10.

#### 4.8.8. Temperatura

La temperatura se registró empleando el multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star y se expresó en  $^{\circ}\text{C}$ .

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Montaje del fotobiorreactor tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas

Las condiciones adecuadas para la instalación y operación del fotobiorreactor (*photobioreactor*, PBR) tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas se establecieron en base a resultados obtenidos en bioensayos en modo de operación semi continuo empleando matraces erlenmeyer de 1 L para el cultivo de microalgas *Chlorella sp.* La cepa nativa de microalga *Chlorella sp.* se fortaleció y acondicionó por 6 meses utilizando el medio de proteosa de acuerdo al protocolo indicado en la sección de Materiales y Métodos. El fotobiorreactor fue instalado a finales del mes de enero 2014, con un volumen de 7.2 L de la cepa Nativa I de microalga *Chlorella sp.* El fotobiorreactor fue colocado dentro de una sorbona de extracción de gases que, a su vez, sirvió de aislante de cualquier posible contaminante presente en el medio ambiente. A continuación se describen los bioensayos realizados para montar el fotobiorreactor tubular.

#### 5.1.1. Crecimiento de microalgas *Chlorella* en bioensayos en modo de operación batch

Dos diferentes cepas madre de microalgas fueron estudiadas para poder elegir la cepa más fuerte y saludable y utilizarla en la instalación del PBR. Las cepas evaluadas fueron la cepa nativa *Chlorella sp.* proporcionada por la Escuela de las Fuerzas Armadas ESPE y, la cepa *Chlorella Protothecoides* (o *Chlorella vulgaris*), proveniente de un cultivo madre de la Universidad de Texas, Estados Unidos. En el caso de la primera cepa, se contaba con un cultivo Nativa I; y, en el caso de la segunda cepa, con tres cultivos que fueron CL USA 1-2-3, EXP USA 1 y EEUU 1-2, respectivamente. En la Figura 6 se presenta una fotografía de las

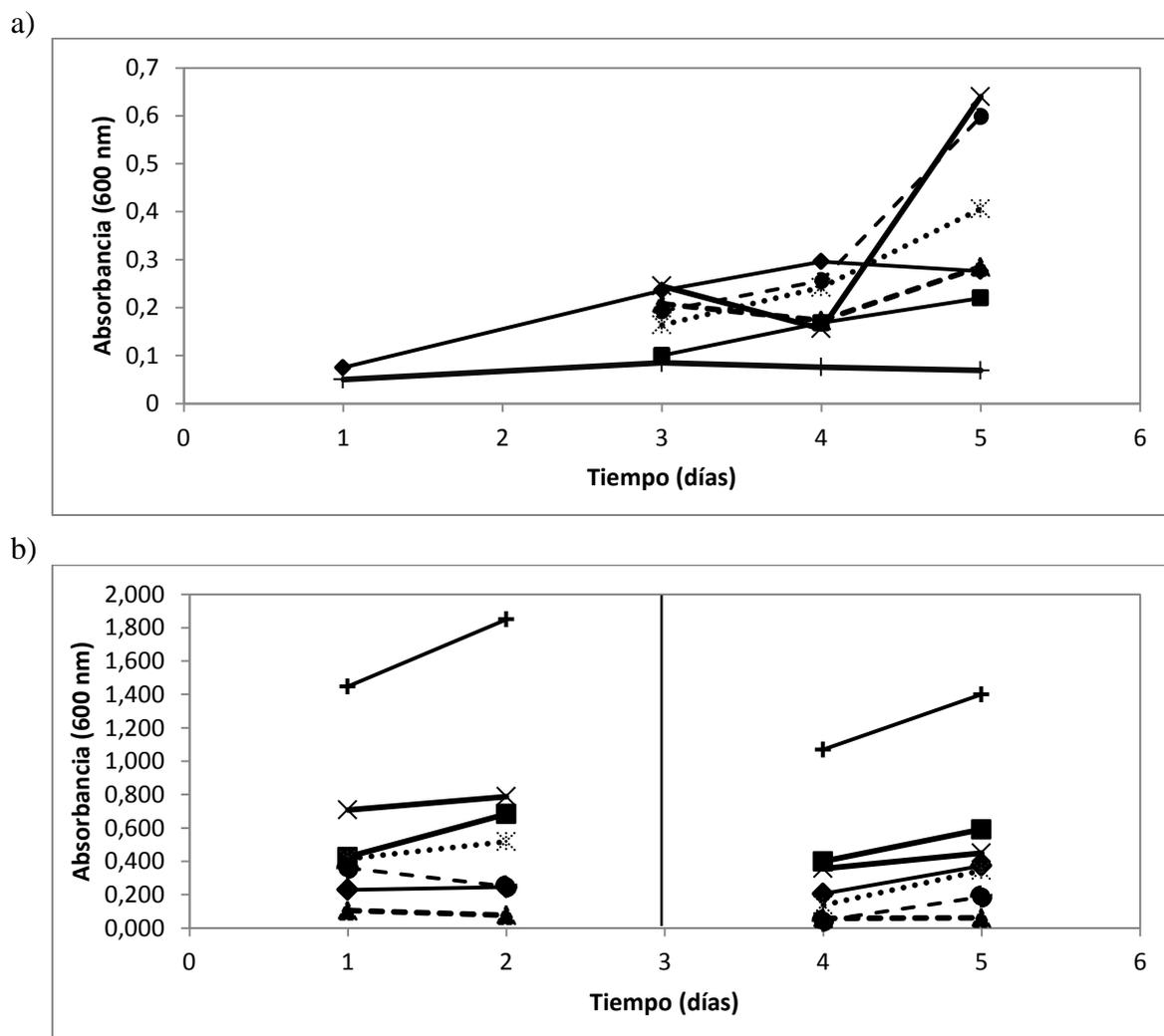
microalgas de las dos cepas estudiadas. Las cepas fueron evaluadas en ensayos semi-batch bajo condiciones controladas de operación; temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y agitación manual una vez al día.

En este estudio el crecimiento de algas fue evaluado visualmente y mediante mediciones de la absorbancia expresada como densidad óptica (DO). La coloración verde característica de la microalga *Chlorella*, se debe a la presencia de cloroplastos en sus células; que, a su vez, son los organelos encargados de la fotosíntesis (Beer et al., 2009; Guschina & Harwood, 2006). La fotosíntesis es el proceso fundamental para la síntesis de biocombustibles ya que convierte la energía lumínica en biomasa, hidratos de carbono, lípidos y/o H<sub>2</sub> (Beer et al., 2009). De los cuatro cultivos de las cepas analizadas, Nativa I presentó un color verde oscuro más fuerte que los demás. En el caso de los 3 ensayos de CL USA, CL USA 2 era el único cultivo que poseía un color verde oscuro similar al de Nativa I. En el caso del cultivo EXP USA 1, éste contaba con alta densidad de algas; pero, en cuanto a su coloración las algas presentaban un color verde marrón. Finalmente, los cultivos EEUU 1 y 2 mostraban algas de color verde claro con cierta coloración caqui, indicando la posibilidad de que las microalgas estén enfermas.

En cuanto a la DO medida, las longitudes de onda empleadas de 600 y 680 nm fueron escogidas debido a la capacidad de adsorción de la radiación en ese rango del espectro electromagnético por parte de las clorofilas alfa y beta, respectivamente (Dávila Gavilanes, 2013). En la Figura 7 se presenta el monitoreo del crecimiento de algas mediante medición de absorbancia en longitud de onda de 600 nm para ensayos semi-batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad para (a) cultivos de microalgas evaluados en el mes de mayo 2013 y (b) cultivos de microalgas evaluados en el mes de agosto 2013.



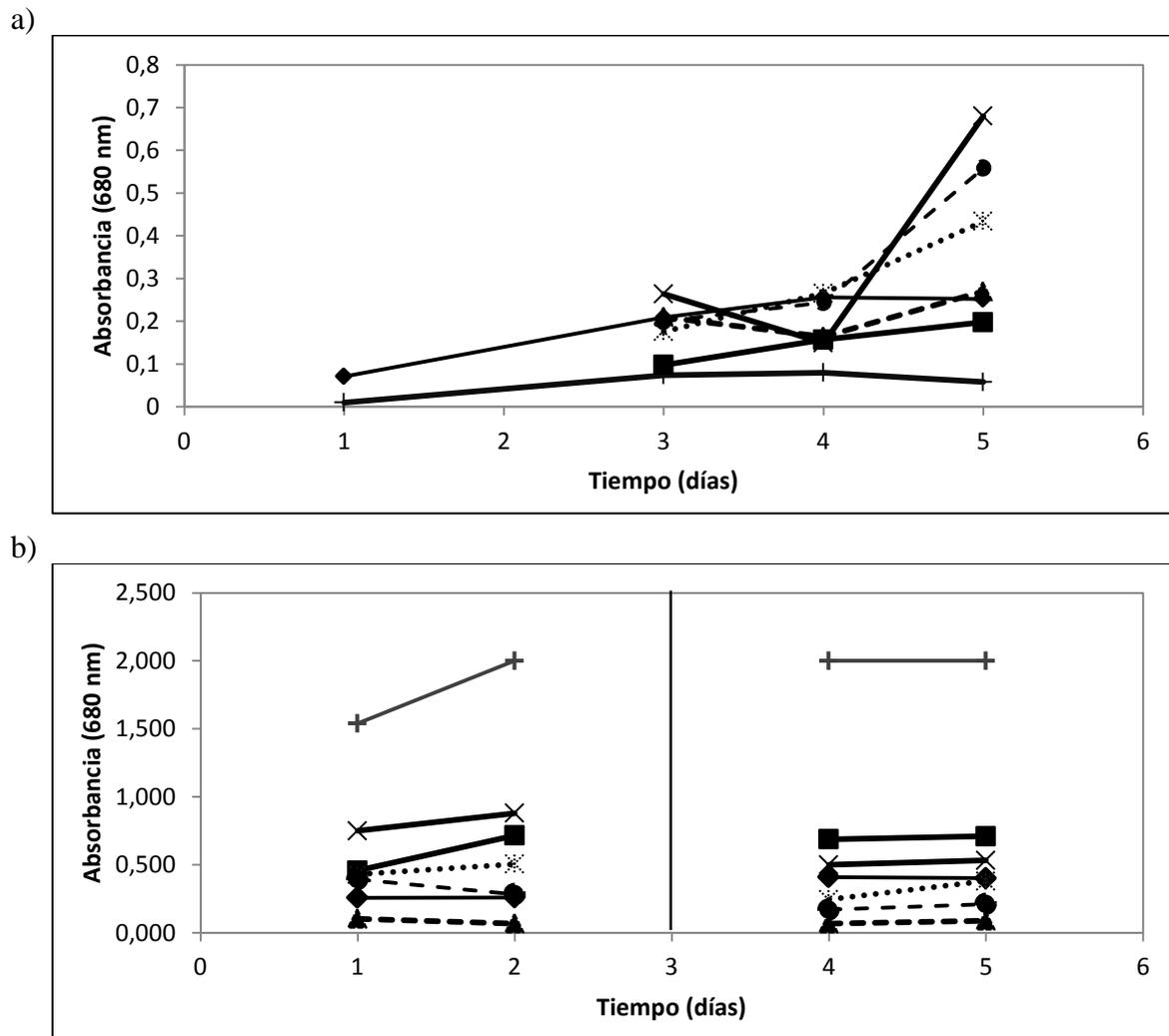
**Figura 6.** Cultivos semi-batch de las cepas *Chlorella* sp. y *Chlorella vulgaris*.



**Figura 7.** Monitoreo de crecimiento de algas mediante medición de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm para ensayos semi-batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y agitación manual una vez al día. a) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de mayo 2013. b) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de agosto 2013. Leyenda: (—+—) Nativa I, (—◆—) CL USA 1, (—■—) CL USA 2, (—▲—) CL USA 3, (—×—) EXP USA 1, (··\*··) EEUU 1, (-●-) EEUU2; la línea vertical corresponde al día en el que se cambió de medio.

La DO se midió principalmente en la longitud de onda de 680 nm debido a que la síntesis de ácidos grasos está mediado por el fotosistema II que es rico en clorofila beta (también conocida como P680) y tiene una adsorción a dicha longitud de onda (Beer et al., 2009; Muthukumar et al., 2012). En la Figura 8 se presentan las mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 680 nm para ensayos batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y agitación manual una vez al día para (a) cultivos de microalgas evaluados en el mes de mayo 2013 y (b) cultivos de microalgas evaluados en el mes de agosto 2013.

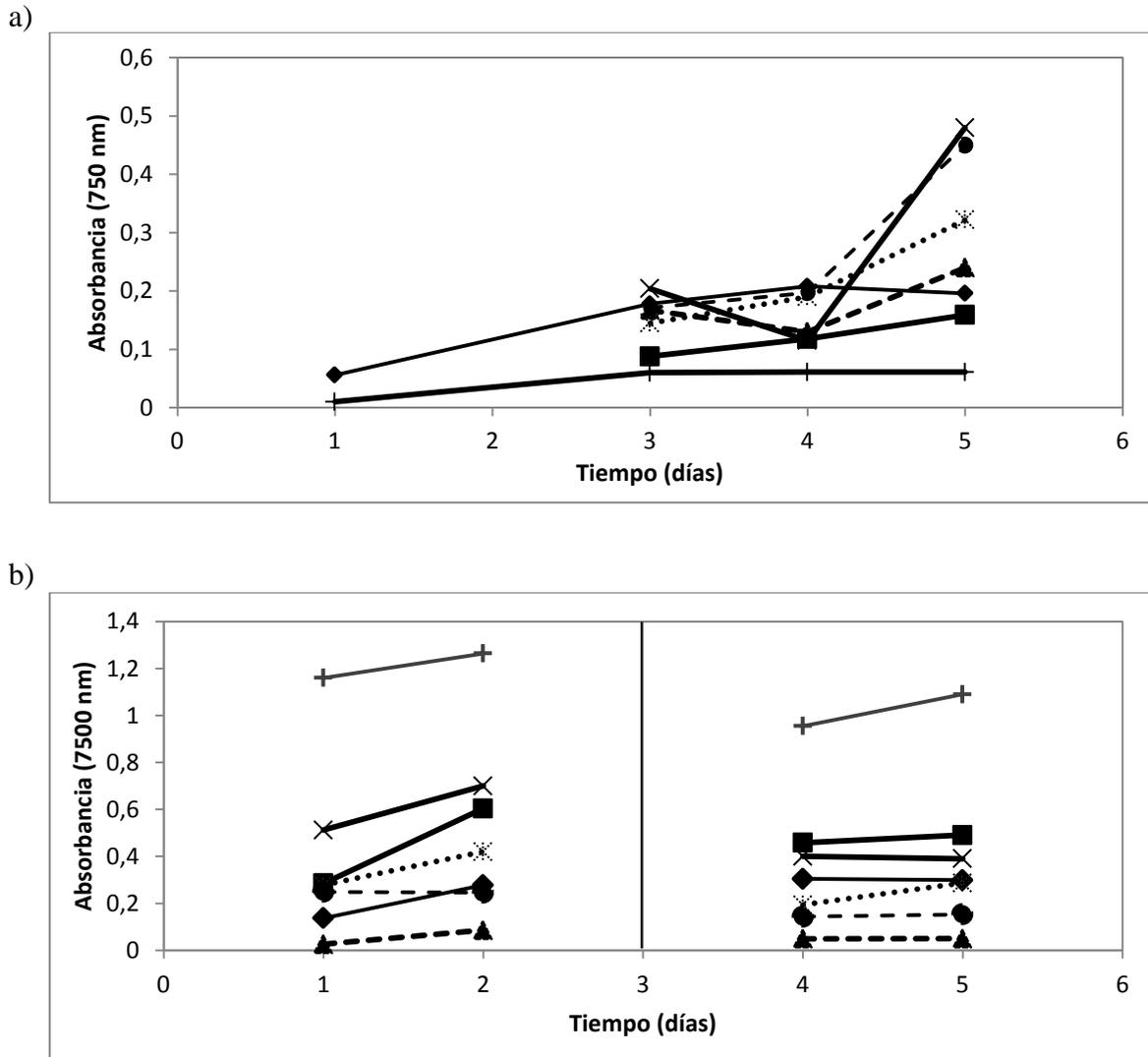
El cambio de medio de los 7 ensayos batch de microalgas se lo realizó al tercer día de cultivo debido a los elevados valores de absorbancia (DO) registrados de la cepa de microalgas Nativa I. Como se muestra en la Figura 8, Nativa I muestra un crecimiento acelerado en comparación a las demás; sin embargo, no se pudo registrar más de dos medidas para realizar la comparación con las otras cepas. Los valores de DO medidos de la cepa de microalga Nativa I fueron 1.540 para el día 1 y >2.000 el resto de los días. La literatura indica que valores elevados de absorbancia pueden afectar en la exactitud de las mediciones y se recomienda obtener valores de DO máximos de 1 (Chiu et al., 2009).



**Figura 8.** Monitoreo de crecimiento de algas mediante medición de absorbancia a una longitud de onda de 680 nm para ensayos semi-batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. a) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de mayo 2013. b) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de agosto 2013. Leyenda: (—) Nativa I, (—●—) CL USA 1, (—■—) CL USA 2, (—▲—) CL USA 3, (—×—) EXP USA 1, (··\*··) EEUU 1, (—●—) EEUU2; la línea vertical corresponde al día en el que se cambió de medio.

Finalmente, también se midió la DO en la longitud de onda de 750 nm ya que permite observar la concentración de la biomasa en el medio de cultivo (Eliasson, Riemer, & Wokaun, 1999). En la Figura 9 se presentan las mediciones de absorbancia a una longitud de onda de 750 nm para ensayos batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y agitación manual una vez al día para (a) cultivos de microalgas evaluados en el mes de mayo 2013 y (b) cultivos de microalgas evaluados en el mes de agosto 2013.

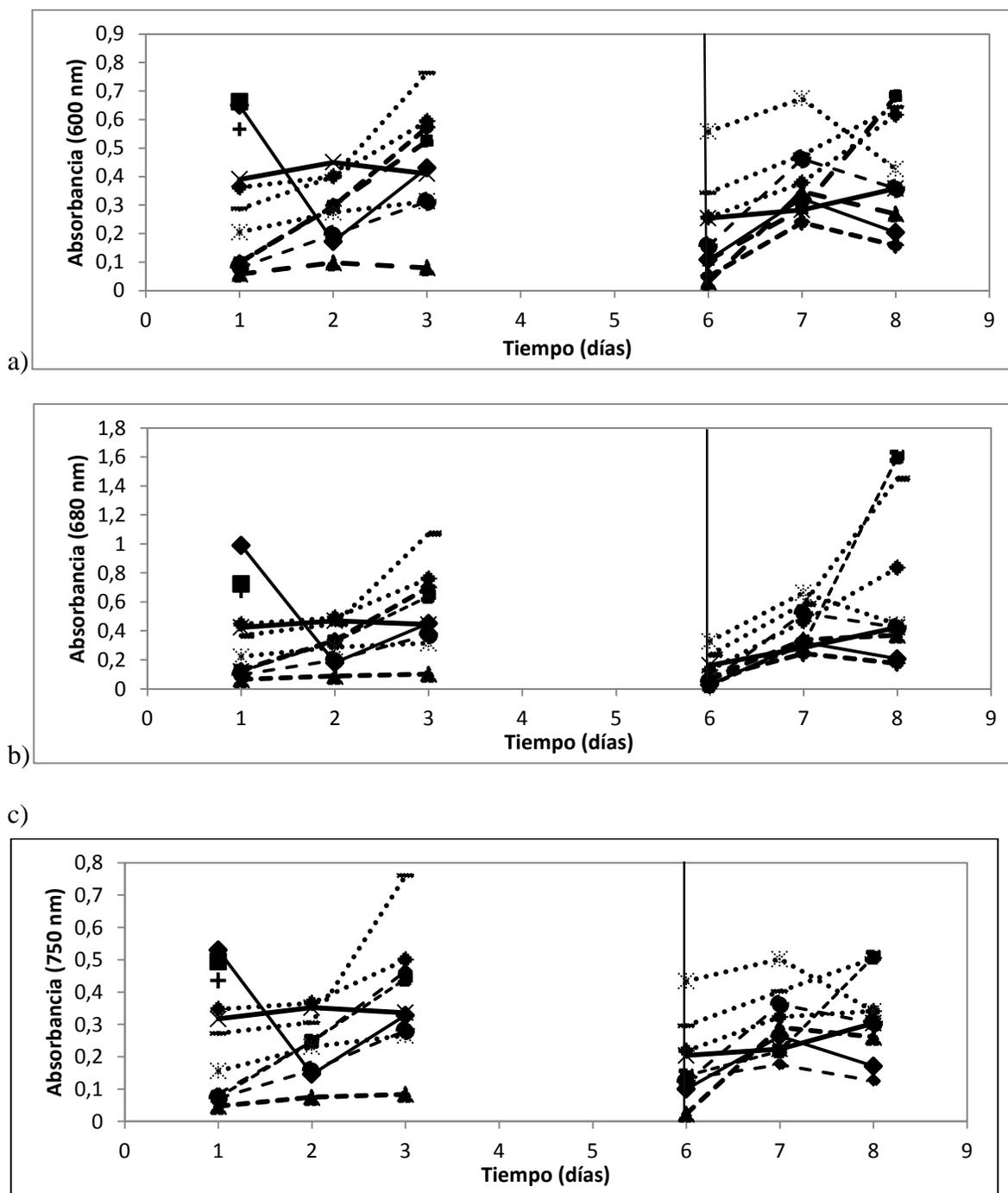
Estos cultivos de microalgas analizados corresponden a los ensayos utilizados en el estudio de Dávila en el cual se identifica a la cepa EXP USA 1 como la más fuerte (Dávila Gavilanes, 2013). Este hecho concuerda con la gráfica a) de las Figuras 6, 7 y 8. Los valores más altos de absorbancia registrados al quinto día de cultivo fueron 0.640, 0.680 y 0.480, en las longitudes de onda de 600, 680 y 750 nm, respectivamente y corresponden a EXP USA 1. El crecimiento de la cepa EEUU 2 le sigue muy de cerca con valores de absorbancia de 0.598 (600 nm), 0.558 (680 nm) y 0.450 (750 nm). El resto de los cultivos registraron valores desde 0.069 a 0.406 en la longitud de onda de 600 nm; 0.058 a 0.434 en la longitud de onda de 680 nm; y, 0.061 a 0.322 en la longitud de onda de 750 nm. Los valores más bajos corresponden a la cepa Nativa I. En base a estos resultados, se decidió cultivar a la cepa Nativa I en el medio con fertilizante, mientras que el resto de cepas se mantuvo con el medio con proteosa sin la concentración de 0.10 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sodio.



**Figura 9.** Monitoreo de crecimiento de algas mediante medición de absorbancia a una longitud de onda de 680 nm para ensayos semi-batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. a) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de mayo 2013. b) Cultivos de microalgas evaluados en el mes de agosto 2013. Leyenda: (—+) Nativa I, (—◆—) CL USA 1, (—■—) CL USA 2, (—▲—) CL USA 3, (—×—) EXP USA 1, (⋯⋯) EEUU 1, (—●—) EEUU2; la línea vertical corresponde al día en el que se cambió de medio.

Las microalgas tienen un ciclo de vida corto (Mata et al., 2010) y un rápido crecimiento (Chisti, 2007), por lo cual la falta de nutrientes influye en su crecimiento (Metcalf & Eddy, 2003; Scragg et al., 2002). La cepa Nativa I, fue cultivada en el medio con fertilizante con el objetivo de recuperarla y mejorar sus condiciones de crecimiento. El resultado obtenido fue mucho mejor de lo que se esperaba. Tres meses después del cultivo de las cepas, en el mes de agosto del 2013, se observó que la cepa Nativa I se encontraba en mejores condiciones que el resto de los cultivos como se ilustra en la gráfica b) de las Figuras 6, 7 y 8. Los valores máximos de DO registrados para la cepa Nativa I fueron 1.850 (600 nm), >2.000 (680 nm) y 1.264 (750 nm); seguida de EXP USA 1 y CL USA 2. EXP USA 1 registró valores de 0.788, 0.880 y 0.700 para las longitudes de onda de 600, 680 y 750 nm, respectivamente. Por otro lado, CL USA 2 mostró valores de 0.684, 0.716 y 0.604 para las longitudes de onda de 600, 680 y 750 nm, respectivamente. El monitoreo diario de las cepas para su comparación se vio limitado por la cepa Nativa I que crecía a una alta velocidad alcanzando e incluso excediendo el rango máximo de medición. De hecho, las curvas de la gráfica b) de las Figuras 6, 7 y 8 indican claramente que Nativa I presenta una densidad de algas del doble en comparación a las otras cepas.

Las microalgas de las cepas Nativa I, CL USA 2 fueron consideradas las más saludables debido al color presentado (Figura 5) y a los altos valores de DO registrados (Figura 6-8). Por esta razón, dichos cultivos fueron replicados para aumentar el volumen de ambas cepas. La Figura 10 muestra el monitoreo de los cultivos de microalgas previamente estudiados y las nuevas réplicas, dos cepas de Nativa I y dos cepas de CL USA 2.



**Figura 10.** Monitoreo de crecimiento de algas mediante medición de absorbancia a una longitud de onda de a) 600 nm, b) 680 nm y c) 750 nm para ensayos batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Leyenda: ( + ) último registro de absorbancia de Nativa I, ( ·◆· ) Nativa I.1, ( ·-· ) Nativa I.2, ( ◆ ) CL USA 1, ( ■ ) última medición de CL USA 2, ( -◆- ) CL USA 2.1, ( -▲-) CL USA 2.2, ( -▲-) CL USA 3, ( -×-) EXP USA 1, ( ·\*· ) EEUU 1, ( -●-) EEUU2; la línea vertical corresponde al día en el que se cambió de medio y las curvas entrecortadas corresponden a las cepas replicadas.

Las replicas de la cepa Nativa I mostraron un crecimiento constante, mejor coloración y valores de DO más altos; motivo por el cual, en el mes de octubre del 2013, se aisló y monitoreó únicamente esta cepa y se empezó a cultivar en el medio de proteosa descrito en la sección 4.3.1 de Materiales y Métodos para empezar a adaptar a la microalga a la concentración de  $0.10 \text{ g L}^{-1}$  de bicarbonato de sodio. La cepa fue separada en 8 matraces erlenmeyer cada uno con un volumen de 500 mL. Dávila indica que el crecimiento de la población de algas de la cepa Nativa I se estabiliza a partir del cuarto al sexto día (Dávila Gavilanes, 2013), por lo cual se decidió realizar el cambio a medio fresco semanalmente. Para inicios del mes de noviembre 2013 ya se contaba con 2800 mL y para mediados del mes con 4300 mL de cultivo puro de cepa de microalga *Chlorella sp.*

Finalmente, para el mes de enero 2014 se monitorearon 12 matraces erlenmeyer de microalga Nativa I presentados en la Figura 11 que ilustra el monitoreo de crecimiento de algas de las réplicas en ensayos batch temperatura  $25^{\circ}\text{C}$ , ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad mediante absorbancia en longitud de onda de a) 600 nm, b) 680 nm y c) 750 nm.

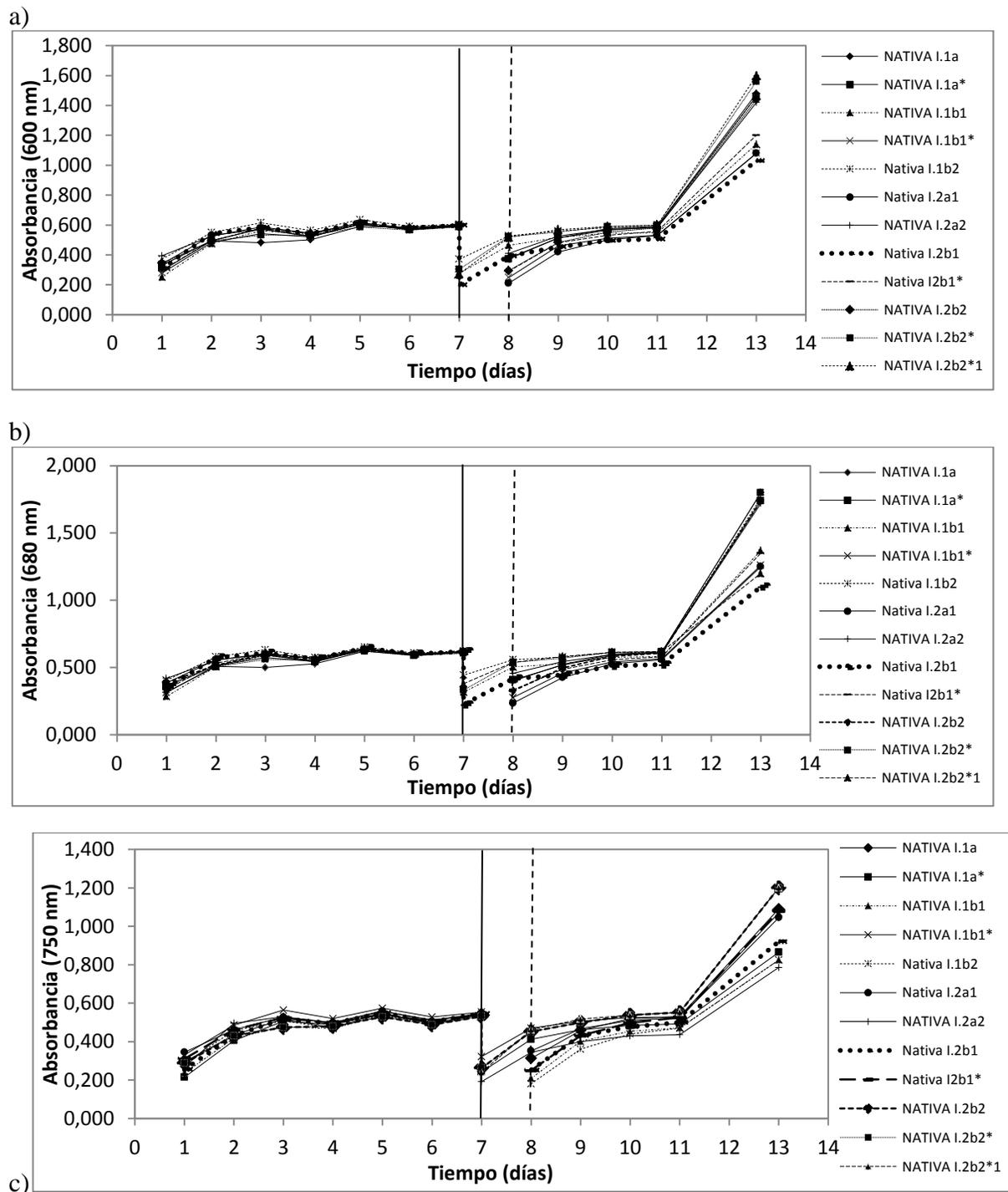
Estudios de la literatura identifican cinco fases de crecimiento de la población de algas en las curva de absorbancia que son latencia, crecimiento exponencial, decaimiento exponencial, estacionaria y de decaimiento o muerte (Dávila Gavilanes, 2013). En este proyecto de investigación debido a la naturaleza de las microalgas y su rapidez de crecimiento, no se logró identificar una fase de latencia. En la Figura 11 se puede observar que en los primeros tres días se lleva a cabo el crecimiento exponencial. En el cuarto día ocurre la fase de decaimiento exponencial para en el quinto y sexto día recuperarse y pasar a la fase de estacionaria. El crecimiento de las microalgas se detiene una vez que consumen todos los nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo. Al no existir una mezcla continua, las

microalgas no están todo el tiempo en contacto con los nutrientes del medio, por lo que con agitación manual, se observa un mayor crecimiento de las microalgas. En el día 12 no se tomaron datos de absorbancia pero si se realizó una agitación manual de los matraces erlenmeyer con las microalgas lo que probablemente ocasionó un aumento de la absorbancia. En el día 13 se registró un valor máximo de DO entre 1.030 – 1.600 en la longitud de onda de 600 nm, 1.100 – 1.800 en la longitud de onda de 680 nm y 0.786 – 1.110 en la longitud de onda de 750 nm.

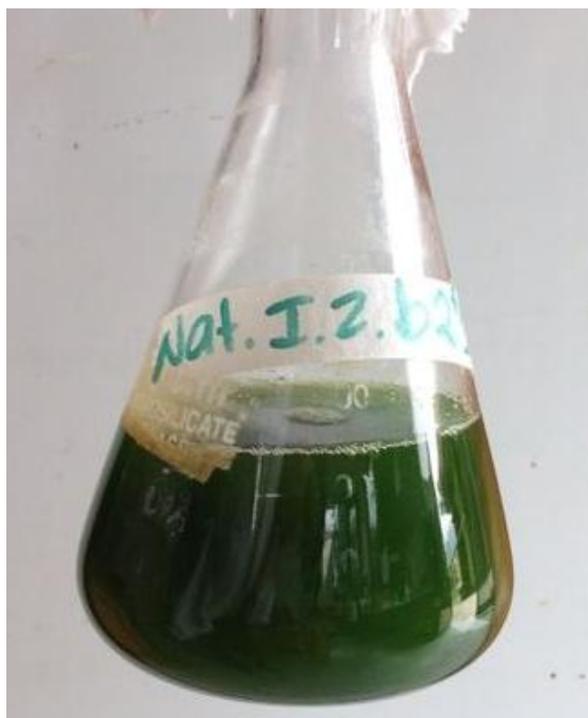
Las condiciones de la cepa nativa *Chlorella sp.* fueron evaluadas analizando el cultivo Nativa I.2.b2\* en base a la medición de la densidad de biomasa de algas y el porcentaje de lípidos de acuerdo a los protocolos descritos en la sección 4.6.1 y 4.6.2 de Materiales y Métodos, respectivamente. Este cultivo fue elegido debido a que presentó los valores más altos de densidad óptica en las tres longitudes de onda evaluadas. En la Tabla 2 se presentan los valores de la densidad celular y contenido de lípidos de *Chlorella sp.* Cabe indicar que el contenido de lípidos obtenidos en este estudio es mayor a 6.89 % w/w alcanzado en el estudio de Dávila bajo las mismas condiciones de cultivo (Dávila Gavilanes, 2013). En la Figura 12 se presenta el cultivo de microalgas de la cepa Nativa I.2.b2\* correspondiente a algas saludables y mostrando gran contenido de clorofila debido al color verde oscuro que posee. Finalmente, para el montaje del fotobiorreactor todos los bioensayos de cultivo de *Chlorella sp.*, Nativa I fueron colectados alcanzando un volumen total de 7.28 L.

**Tabla 4.** Datos de densidad celular y contenido de lípidos de la cepa *Chlorella sp.* previo a la instalación del fotobiorreactor, en los ensayos batch.

Parámetro	Unidad	Valor
Densidad celular	g L <sup>-1</sup>	0.7692
Contenido de lípidos	% w/w	7.31



**Figura 11.** Monitoreo de crecimiento de algas mediante medición de absorbancia a una longitud de onda de a) 600 nm, b) 680 nm y c) 750 nm para ensayos batch a temperatura 25°C, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Leyenda: la línea vertical corresponde al día en el que se cambió de medio a las réplicas I.1b1, I.1b2, I.2b1, I.2b2\*, I.2b2\*1 y la línea entrecortada corresponden al día en que se cambió de medio al resto de las cepas.

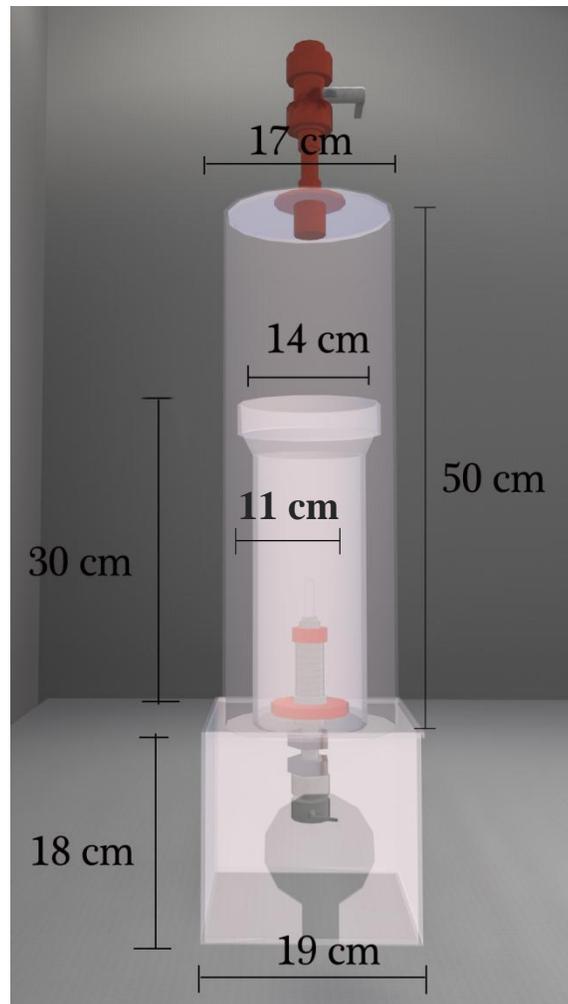


**Figura 12.** Cultivo de la cepa Nativa I.2.b2\* (400 mL) escogida para realizar la determinación de densidad celular y contenido de lípidos previo al montaje del fotobiorreactor.

### **5.1.2. Montaje del fotobiorreactor (PBR) tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas**

El empleo de fotobiorreactores ha sido ampliamente estudiado debido a las ventajas de su uso para la producción de biodiesel (Acién Fernández, Fernández Sevilla, Sánchez Pérez, Molina Grima, & Chisti, 2001; Molina et al., 2001; Molina Grima et al., 1999; Rodolfi et al., 2009). En la Figura 13 se presenta una representación del fotobiorreactor tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas diseñado por el Dr.-Ing. Rodny Peñafiel. El fotobiorreactor tubular construido en plexiglas con un volumen de 10 L está compuesto de un cilindro exterior con una altura de 50 cm y diámetro de 17 cm y un cilindro interior con una altura de 30 cm y diámetro de 11 cm; por este último, ingresa aire mediante una bomba de acuario por la parte inferior del cilindro a través de una manguera, válvula de control y regulación del flujo. El cilindro exterior del fotobiorreactor se apoya sobre un soporte rectangular con una altura y ancho de 18 cm, y 19 cm de largo. Además cuenta con una tapa de 18 cm de diámetro y una válvula regulable de salida de aire y un orificio pequeño para la toma de muestras. En el caso del volumen de las microalgas (aproximadamente 8 L), sobrepasaba a penas al cilindro interno y tiene una altura desde la base de 40 cm.

El PBR tubular fue desinfectado previo a su instalación y fue sumergido en una solución de ácido nítrico al 1% por un día, a continuación se lavó con agua destilada y se lo dejó secar completamente durante dos días. No se utilizó cloro, como se recomienda en el estudio de Dávila (2013) debido a que restos de cloro podría afectar a las microalgas y generar toxicidad, el hipoclorito es conocido por evitar la proliferación de algas u hongos (Asociación Nacional de Electroquímica, 2012).

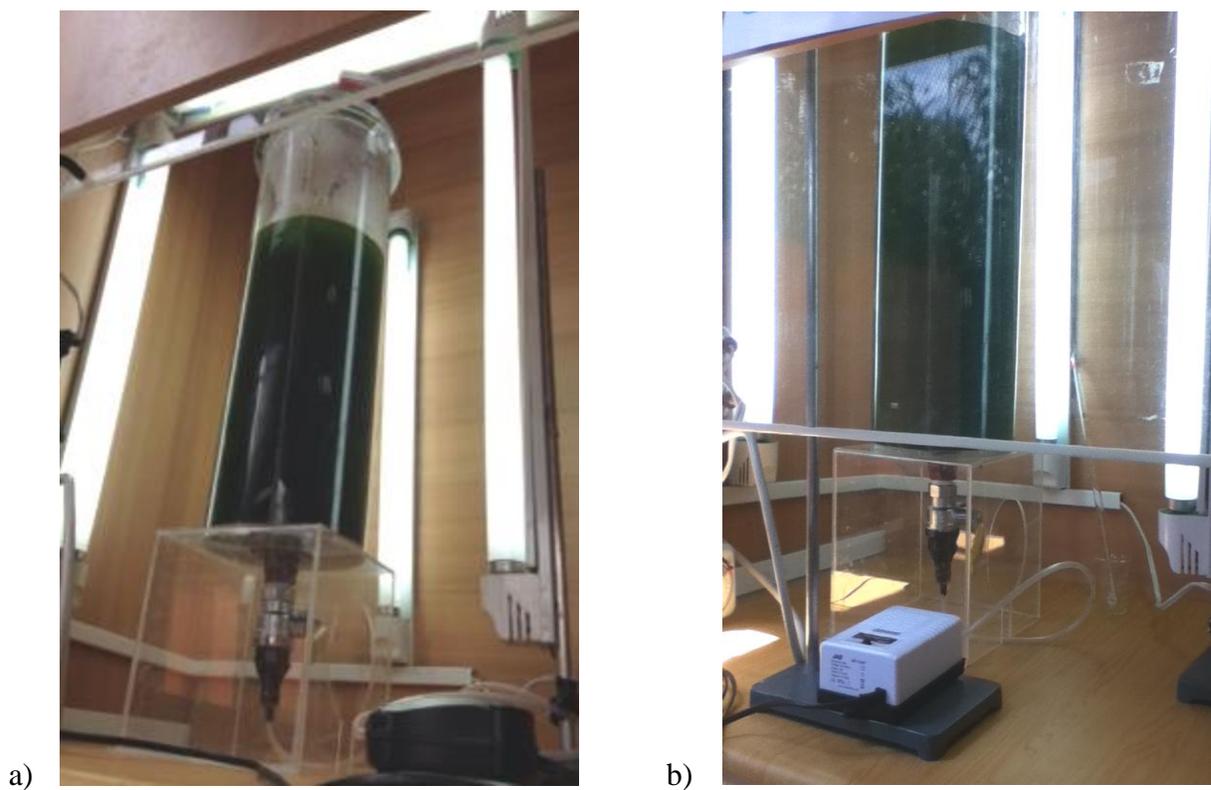


**Figura 13.** Representación en 3D Autocad del fotobiorreactor tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas diseñado por Felipe Mosquera & Dr.-Ing. Ródney Peñafiel.

## **5.2. Condiciones de operación del fotobiorreactor (PBR) tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas para la optimización de la tasa de producción de lípidos**

El proceso de operación y el flujo necesario para poder establecer una mezcla completa en el PBR fueron evaluados en este proyecto de investigación. Varios estudios se han reportado en la literatura acerca del efecto en la producción de biomasa y lípidos de la temperatura (Goldman, 1979; Guschina & Harwood, 2006; Moronta, Mora, & Morales<sup>1</sup>, 2006), el pH (Kumar, Suseela, & Toppo, 2011; Liang, Mo, Tang, & Zhou, 2011; Moronta et al., 2006), la iluminación (Merchuk, et al., 1998; Molina Grima et al., 1999; X. Wu & Merchuk, 2001) y los nutrientes presentes en el medio de cultivo (Abdelaziz et al., 2013; Abou-shanab et al., 2012; Deng, Fei, & Li, 2011; Yecong Li et al., 2011). Estos estudios se han realizado por separado y fueron útiles para el montaje del PBR tubular de este proyecto.

El PBR tubular fue instalado inicialmente con una bomba de aire (BOYU SA-800, Raoping, China) con un flujo de  $2.5 \text{ L min}^{-1}$ ; y, debido a la baja potencia de la misma, provocando una mezcla ineficiente, se cambió a una bomba de aire (BOYU SC-7500, Raoping, China) de  $3 \text{ L min}^{-1}$ . Durante los primeros 15 días, la aireación fue administrada durante 7 horas y el volumen inicial de microalgas en el PRB tubular fue 7.5 L, sobrepasando así el cilindro interno para poder permitir un correcto flujo del aire y asegurar la mezcla continua. La Figura 15 muestra al fotobiorreactor tubular de 10 L montado, la figura a) corresponde al montaje inicial con 7.2 L de cultivo de la cepa nativa de microalgas *Chlorella sp.* con una aireación de  $2.5 \text{ L min}^{-1}$  y la figura b) corresponde al PBR lleno con 8 L del de la cepa nativa de microalgas *Chlorella sp.* con una aireación de  $3 \text{ L min}^{-1}$ .



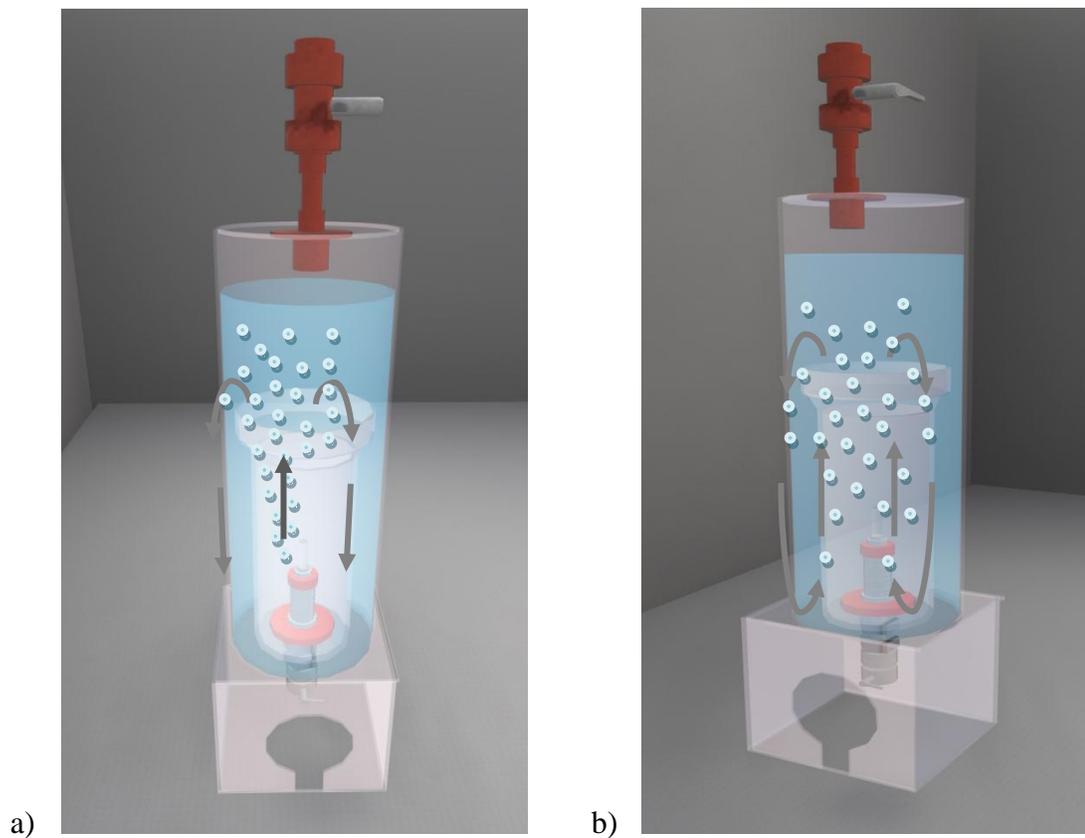
**Figura 14.** Fotobiorreactor tubular de 10 L instalado. Iluminación provista por 5 lámparas de luz fría OSRAM de 20W y aireación provista por una bomba de aire con un flujo de a)  $2.5 \text{ L min}^{-1}$  y b)  $3 \text{ L min}^{-1}$ .

En la literatura se establecen flujos volumétricos y/o lineales para el funcionamiento de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. Molina *et al.* realizaron un estudio sobre el efecto de la velocidad del líquido, la irradiancia y la tasa de dilución en el cultivo de microalga *Phaeodactylum tricorutum* en un PBR (Molina et al., 2001). En dicho estudio se identificó que velocidades lineales del líquido de entre 0.35 y 0.50 m s<sup>-1</sup> daban como resultado productividades de biomasa similares (alrededor de 1.90 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) y que velocidades menores provocaban el colapso del cultivo (Molina et al., 2001). Los resultados obtenidos en este estudio, en base a la bomba utilizada (3 L min<sup>-1</sup>) y el diámetro de la válvula de aire (5 mm), indican que la velocidad lineal del flujo de aire en el PBR es de 2.5 m s<sup>-1</sup>, un orden mayor a las reportadas por Molina *et al* y para la cual no se tiene estudios sobre su efecto. En el presente trabajo de investigación la tasa de productividad de lípidos, obtenida durante la fase de crecimiento exponencial de las microalga nativa *Chlorella sp* en el PBR, fue 0.414 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> con una tasa de flujo de aire de 0.375 vvm (volumen de gas por volumen de reactor por minuto). Estos resultados son consistentes con estudios de la literatura que indican que en cultivos fototróficos de experimentos de fijación de CO<sub>2</sub> la tasa de productividad de lípidos reportada fue 0.179 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> a una tasa de flujo del gas de 0.25 vvm (Chiu et al., 2009) y una tasa de 0.256 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para *Tetraselmis subcordiformis* a un flujo de gas de 0.35 vvm (Zheng, Chen, Lu, & Zhang, 2011). En vista de que el flujo es muy similar a los utilizados en otros experimentos, se decidió mantener la aireación con un flujo de 3 L min<sup>-1</sup>. Cabe indicar que, a pesar de ser un flujo fuerte y crear burbujas de aproximadamente 3 mm de diámetro, las microalgas se sedimentaron en el fondo del PBR lo que dificultaba el monitoreo de la biomasa de algas a través de mediciones de DO. Este problema se solucionó mediante la instalación de dispersores de aire, explicado en la sección a continuación.

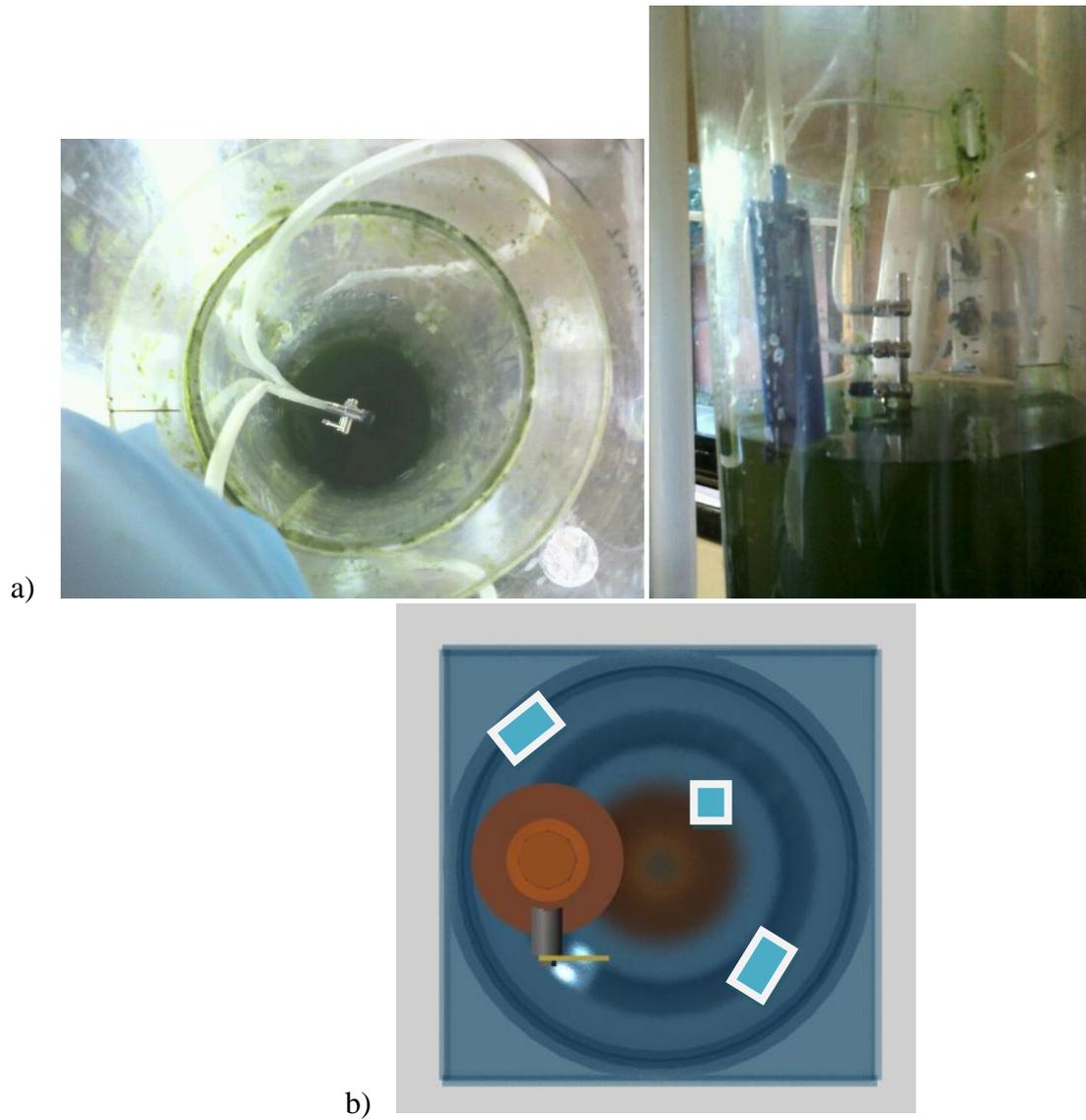
### 5.2.1. Aireación

La aireación es crucial para el crecimiento de las microalgas en el fotobiorreactor tubular. De igual forma, el flujo de aire provisto debe mantenerse a un bajo nivel para minimizar el estrés y no romper las células de las microalgas (Kaewpintong, Shotipruk, Powtongsook, & Pavasant, 2007). Una correcta aireación permite una mezcla completa, sin dañar las células de las microalgas y una remoción del oxígeno acumulado en el proceso de fotosíntesis.

Wu *et al.* presentan un diseño de un PBR espiral; en su estudio se evalúa y compara el flujo de aire en diferentes secciones transversales de un PBR espiral y un tubular. Los perfiles de velocidad en diferentes secciones transversales a lo largo de los PBRs espiral y tubular se presentan en el Anexo 1. Los resultados de la investigación determinan que la forma del PBR espiral permite tener altas y mejores condiciones de mezclado bajo un flujo laminar ( $Re = 500$ ) que en el PBR (L. B. Wu, Li, & Song, 2009). El desempeño del mezclado en el PBR afecta el acceso a los nutrientes así como la disponibilidad de luz a las células de las microalgas (L. B. Wu *et al.*, 2009). La Figura 15 indica la representación del flujo de aire en el reactor, la figura a) indica la mezcla obtenida en el PBR y la figura b) la mezcla ideal que se desea en el PBR. Varios investigadores proponen mezcladores estáticos para generar una mezcla efectiva del líquido y mejorar el rendimiento de transferencia de masa dentro de un PBR tubular (Merchuk *et al.*, 1998; Ugwu, Aoyagi, & Uchiyama, 2008; X. Wu & Merchuk, 2001). En el presente proyecto se decidió instalar 3 dispersores para mejorar la mezcla dentro del PBR, reducir el tamaño de burbuja y la velocidad del líquido. En la Figura 16 se presenta a) una fotografía de la instalación de los dispersores en el PBR del estudio y b) una representación de la distribución de los dispersores.



**Figura 15.** Bombeo de aire desde la parte inferior del fotobiorreactor con una bomba de aire. Movimiento de las microalgas desde la zona de oscuridad (interior) a la zona fótica (paredes laterales y superficie superior). La figura a) corresponde al flujo observado en el PBR instalado y la figura b) representa la mezcla ideal provocada por el flujo de aire. Representación 3D realizada en Autocad.



**Figura 16.** Instalación y distribución de los dispersores en el fotobiorreactor. Las fotografías a) corresponden a la instalación de los dispersores en el PBR tubular y la figura b) corresponde a la vista superior en Autocad del PBR con la ubicación de los 3 dispersores.

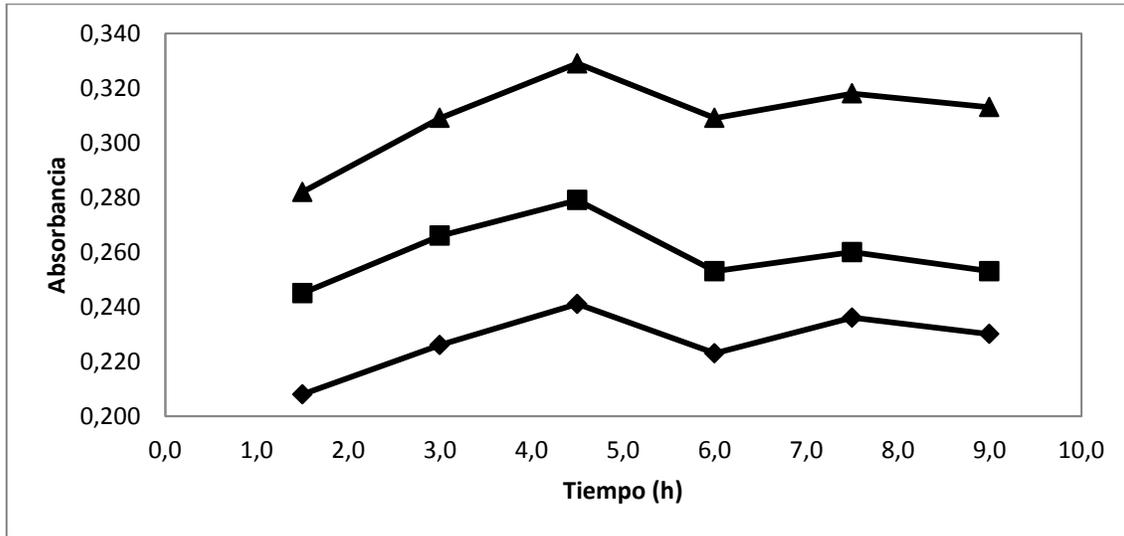
### 5.2.2. Alimentación e iluminación

Las condiciones de alimentación se establecieron en base al comportamiento del crecimiento de las microalgas en el PBR tubular. En la literatura se menciona que las microalgas duplican su biomasa durante las primeras 24 horas, la duración del crecimiento exponencial generalmente es de 3.5 h (Chu, 2012). Para determinar la tasa de alimentación del PBR se realizaron mediciones de DO y densidad de algas cada hora y media. La Figura 17 indica el monitoreo del crecimiento de algas en el PBR tubular durante la fase exponencial mediante la medición de a) absorbancia en las longitudes de onda de 600, 680 y 750 nm y b) densidad de algas o SST ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos concuerdan con lo mencionado por Chu en su estudio de las aplicaciones biotecnológicas de las microalgas (Chu, 2012). Las gráficas de la absorbancia indican que el mayor valor registrado fue a las 4.5 h de cambiado el medio y la más alta densidad de algas obtenida de  $638.0 \text{ mg L}^{-1}$  a la misma hora. La alimentación del medio en el reactor se realizó inicialmente en forma semi-batch, realizando cambios semanales de 2 a 3 L; una vez realizado este análisis se empezó a trabajar en forma continua con cambios diarios de 200 mL de medio. Mata et al, por otro lado, indican las condiciones específicas y el diseño e implementación de un sistema de cultivo para el crecimiento de microalgas; en el estudio se menciona que el cultivo ideal de un efluente de algas es del 2 al 7 % (Mata et al., 2010). Las extracciones realizadas de los 200 mL de efluente de algas para ser reemplazados por el mismo volumen de medio es de 2.5% del volumen total de microalgas en el PBR. El tiempo de residencia del líquido obtenido fue de 40 días, permitiendo una mayor acumulación y fortalecimiento de las microalgas dentro del PBR tubular.

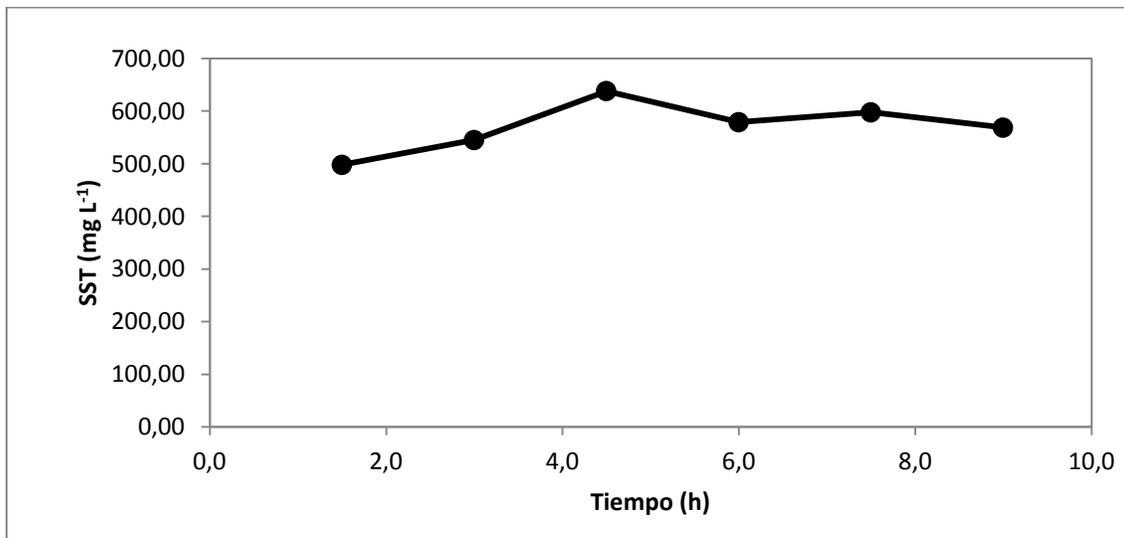
En cuanto a la iluminación, también se pudo evaluar con los resultados obtenidos en la Figura 7. Las tres primeras mediciones se obtuvieron durante el ciclo de oscuridad y las tres últimas en el ciclo de luz. Las mediciones de la absorbancia y la densidad de algas indican un comportamiento similar con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.62. La iluminación está altamente influenciadas por la concentración de la biomasa y el efecto de sombra o fotoinhibición en el caso de existir una alta o baja concentración, respectivamente (Zheng et al., 2011). La disponibilidad e intensidad de la luz son los principales factores que controlan la productividad en cultivos fotosintéticos (Molina Grima et al., 1999). En el presente estudio se obtuvo la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) de la microalga *Chlorella sp.* de  $0.0535 \text{ h}^{-1}$  durante la fase exponencial de crecimiento. Merchuk *et al.* estudia a la microalga roja *Porphyridium sp.*; suministrando una radiación fotosintéticamente activa (Photosynthetic active radiation, PAR) de entre  $150$  a  $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  encuentra que la máxima tasa de crecimiento de  $0.040 \text{ h}^{-1}$  la obtiene a la PAR de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Mediante la ecuación de productividad de (Lee & Shen, 2004) se obtiene una productividad de la biomasa de  $34.13 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , este valor es comparable a el estudio de Zheng *et al.* en el cual se registran valores entre  $10$  y  $34.17 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para la especie de microalga *Tetraselmis subcordiformis* a una PAR de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Zheng et al., 2011). En comparación a la literatura, la iluminación para el presente estudio fue provista a través de 5 lámparas fluorescentes de luz fría de 20W en un periodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad correspondientes a una PAR de  $124.30 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

a)



b)



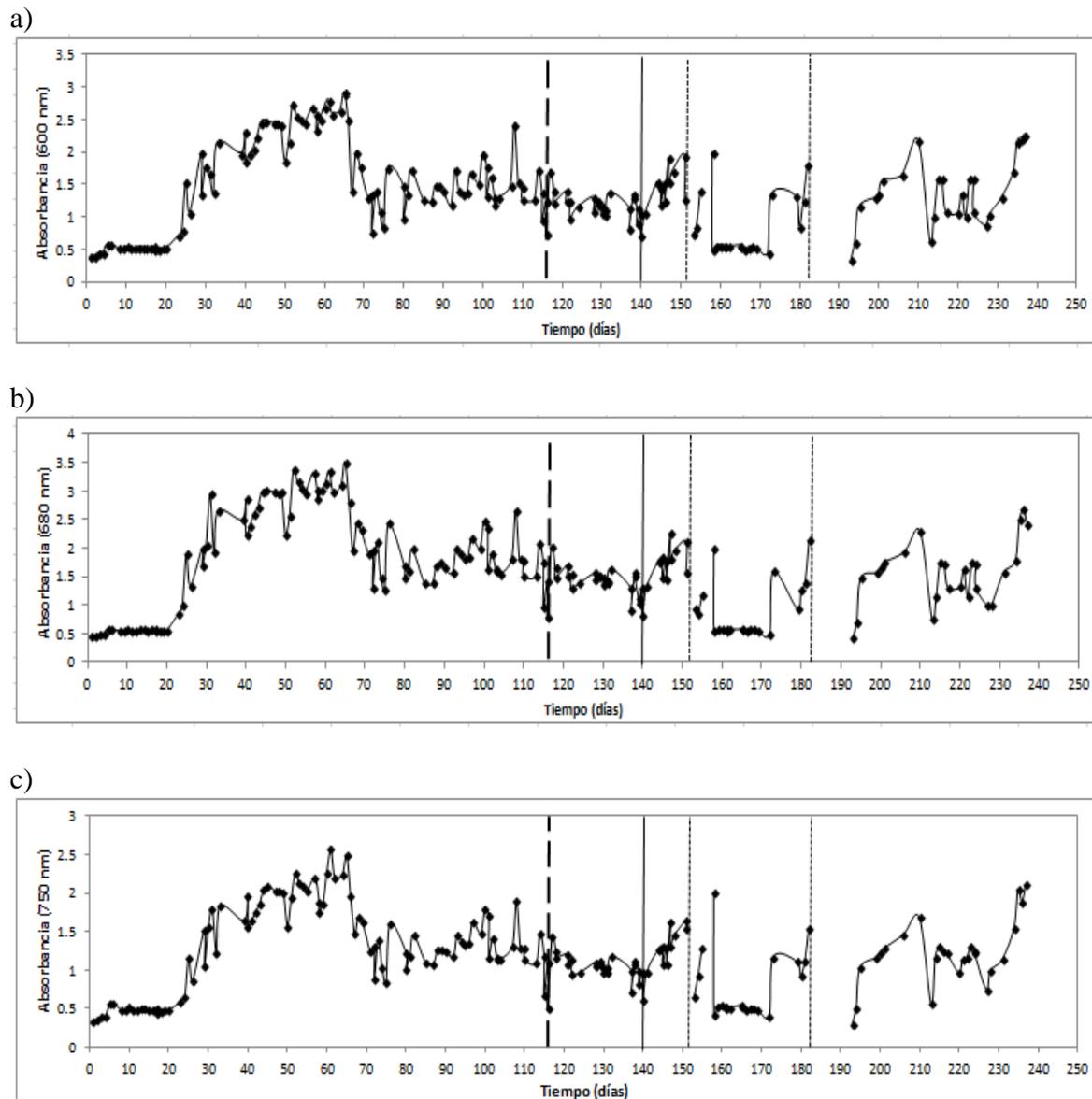
**Figura 17.** Monitoreo del crecimiento de algas en el fotobiorreactor tubular de 10 L durante la fase exponencial mediante la medición de a) absorbancia y b) densidad de algas, SST ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Leyenda: absorbancia en la longitud de onda de (■) 600 nm, (▲) 680 nm y (◆) 750 nm; densidad de algas en  $\text{mg L}^{-1}$  (●).

### **5.3. Monitoreo del fotobiorreactor tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas**

Durante el monitoreo del fotobiorreactor tubular para el crecimiento autotrófico de microalgas nativas se tomaron datos diarios de absorbancia expresada como densidad óptica (DO) y se determinó la biomasa de algas y el contenido de lípidos cada dos semanas inicialmente y posteriormente en base a los resultados de DO. Una vez que se estabilizaron los valores de densidad óptica, se procedió a monitorear los parámetros físico-químicos. Las mediciones de los parámetros físico-químicos, se empezaron a realizar cuatro meses después de instalado el fotobiorreactor.

#### **5.3.1. Densidad óptica (DO), biomasa de algas y contenido de lípidos**

El crecimiento celular en el fotobiorreactor tubular se monitoreó utilizando el protocolo descrito previamente en la sección 4.4 de Materiales y Métodos. En la Figura 18 se presenta el monitoreo del crecimiento de algas en el fotobiorreactor tubular de 10 L mediante medición de DO en longitudes de onda de a) 600 nm, b) 680 nm y c) 750 nm. 2 a 3 L de medio de cultivo fue cambiado regularmente durante los primeros 120 días de funcionamiento del fotobiorreactor tubular. La línea entrecortada indica que a partir del día 116 se realizaron extracciones diarias de 200 mL de medio viejo y se reemplazó con el mismo volumen de medio con, la línea vertical corresponde al día 140 en el que se instalaron los dispersores y las líneas punteadas a los días 153 y 184, cuando se regó el contenido del fotobiorreactor. La absorbancia fue medida a diario en el PBR y estos valores fueron aumentando gradualmente hasta obtener una  $DO > 2.000$  por lo cual fue necesario emplear diluciones, y para el segundo mes se escogió un factor de dilución 1:5 para la medición de la absorbancia.

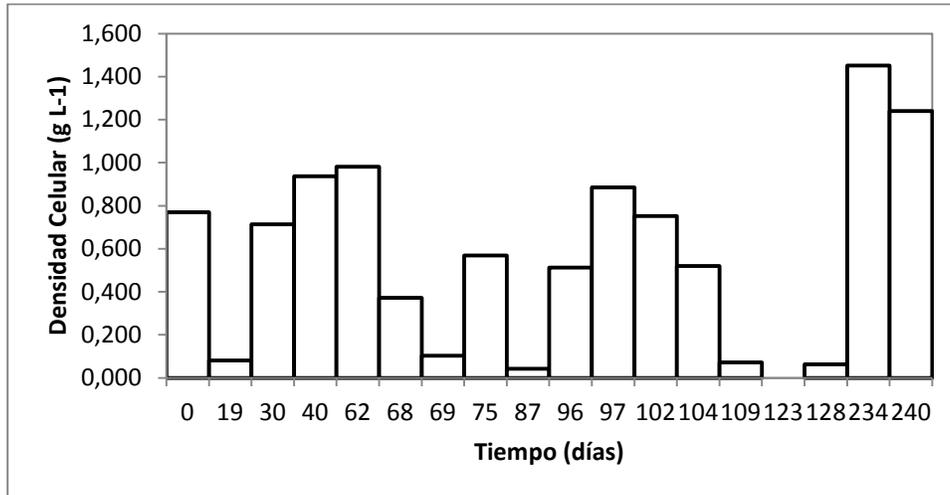


**Figura 18.** Monitoreo de crecimiento de algas en el fotobiorreactor tubular de 10 L mediante medición de absorbancia en longitud de onda de a) 600 nm, b) 680 nm y c) 750 nm, ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El medio de cultivo se cambió regularmente (2 a 3 L) durante los primeros 110 días de funcionamiento del PBR tubular. Leyenda: (♦) absorbancia. La línea entrecortada corresponde a la fecha a partir de la cual se realizaron extracciones diarias de 200 mL de medio viejo y se reemplazo con el mismo volumen de medio con proteosa (día 116), la línea vertical corresponde al día en que se instalaron los dispersores (día 140) y las líneas punteadas a los días en que se regó el contenido del fotobiorreactor (días 153 y 184).

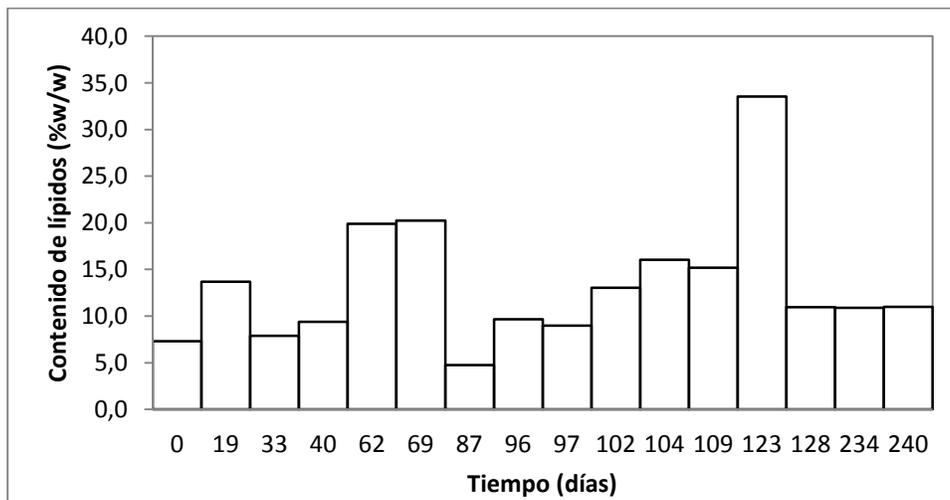
El PBR inició con valores de DO de 0.396, 0.452 y 0.343 en las longitudes de onda de 600, 680 y 750 nm, respectivamente y para la primera semana se obtuvo valores finales de 0.586 (600 nm), 0.586 (680 nm) y 0.564 (750 nm). Durante el monitoreo del crecimiento de algas en los ensayos batch se identificó que la longitud de onda de 680 nm presentaba los valores más altos de DO. Como se mencionó previamente, esta longitud indica la presencia de clorofila beta en el fotosistema II, en el cual se lleva a cabo la síntesis de ácidos grasos (Beer et al., 2009; Muthukumar et al., 2012). Al notar un cambio en la diferencia de las mediciones de DO se decidió cambiar en mayor cantidad y con mayor frecuencia el medio. Finalmente, a los 116 días se empezó a realizar los cambios de 2.5 % de volumen de algas en el PBR. Esto concuerda, además, con el cambio observado en la DO medida en el PBR. Durante los primeros 20 días, se observa la fase de adaptación de las microalgas en el PBR, la DO varía muy poco y se mantiene en valores medios de 0.5 para todas las longitudes de onda. De los 20 a los 60 días de monitoreo se observa la fase de crecimiento exponencial y, no se observa una fase estacionaria sino que la DO empieza a bajar drásticamente indicando una fase de decaimiento por respiración endógena. Debido a la falta de nutrientes, las microalgas empiezan a autooxidarse para poder obtener energía y cumplir con su metabolismo (Metcalf & Eddy, 2003).

El monitoreo de la concentración de biomasa y contenido de lípidos se llevó a cabo inicialmente realizando extracciones periódicas del cultivo del fotobiorreactor tubular. La frecuencia del muestreo se realizó en base a la curva de crecimiento de población de algas (Figura 18). La Figura 19 indica los ensayos más significativos del monitoreo de a) la densidad de algas y el contenido de lípidos (% w/w) con respecto al tiempo de funcionamiento del PBR tubular.

a)



b)

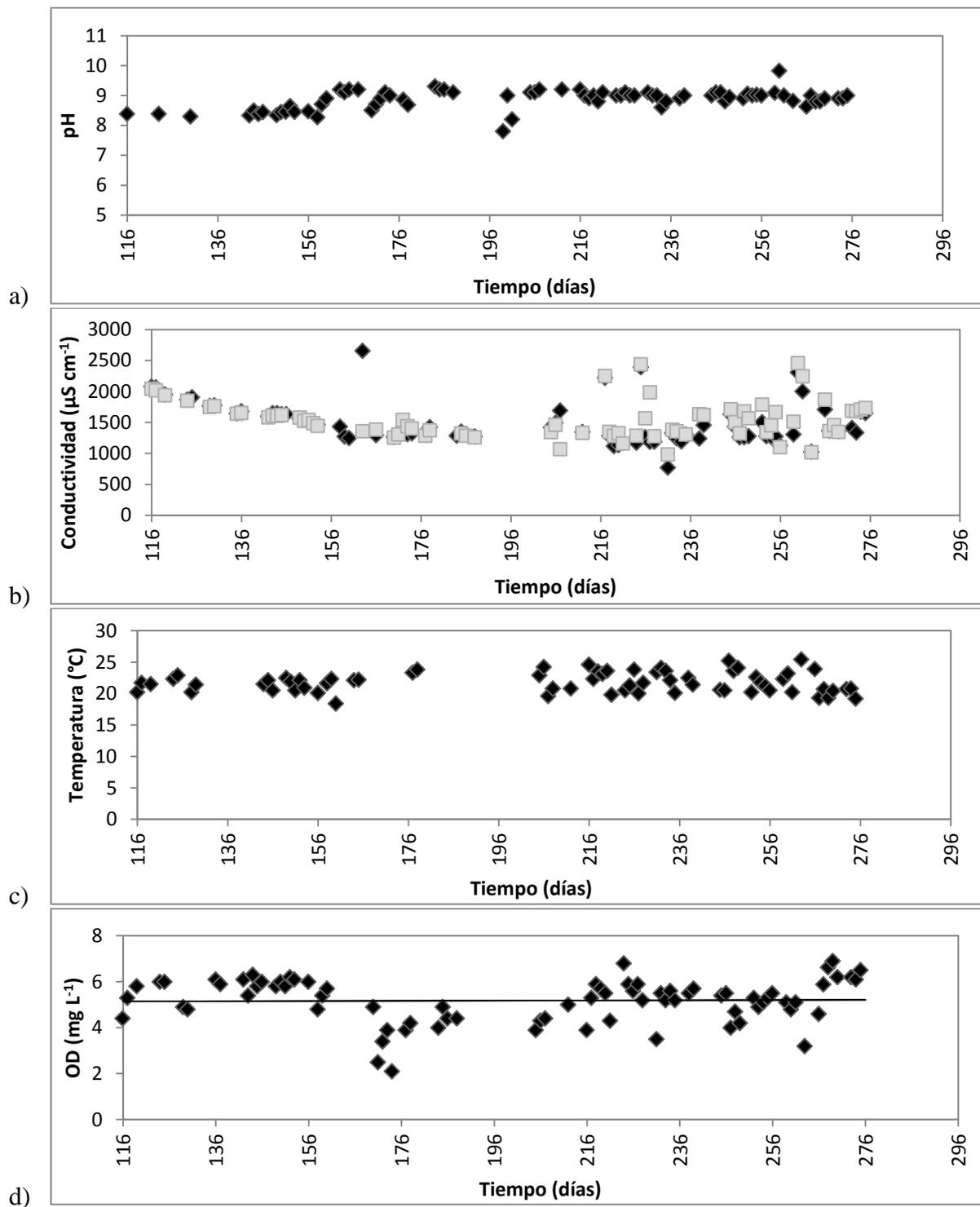


**Figura 19.** Monitoreo de a) densidad celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) y b) contenido de lípidos (%w/w) con respecto al tiempo de funcionamiento del PBR tubular para el crecimiento de microalgas nativas.

Un porcentaje de lípidos obtenido fue 20.23 % w/w 15 días después de que alcanzara el máximo crecimiento de algas. A los 123 días de instalado el fotobiorreactor, el porcentaje de lípidos 33.53%w/w es el máximo registrado. Una semana después de instalados los dispersores. Mata *et al.* registra valores de entre 10 y 48 %w/w para la misma especie de microalga. Por lo tanto, se obtuvo un valor bastante elevado, mayor a lo esperado, casi 5 veces más al contenido de lípidos obtenido previo a la instalación del PBR. La comparación entre la densidad de algas y el contenido de lípidos registrados varía. La densidad celular, Figura 19 a), muestra un comportamiento similar al observado en el crecimiento de algas, va en aumento continuo hasta alcanzar un el mayor crecimiento exponencial, cuando ocurre la fase de decaimiento endógeno, la concentración baja considerablemente y se recupera nuevamente a los 97 días. Alcanza los mayores valores de densidad de algas en los últimos días del funcionamiento del PBR. Sin embargo, el contenido de lípidos no actúa de la misma manera. Ello demuestra que el contenido de lípidos de la microalga *Chlorella sp.* no está relacionado directamente con la cantidad de microalgas presentes en el PBR. En la Figura 19 b), se observa que los valores del contenido de lípidos fluctúan en el tiempo. El contenido de 20.3% se obtiene cuando la densidad de algas es una de las más bajas. Es decir, que condiciones como la iluminación, nutrientes, OD, temperatura y otros, tienen un importante efecto en el contenido de lípidos de las microalgas dentro del PBR (Chisti, 2007; Fernández et al., 2012; Mata et al., 2010; Wahlen et al., 2013).

### **5.3.2. pH, conductividad, oxígeno disuelto y temperatura**

En la Figura 20 se presentan las gráficas del a) pH, b) conductividad, c) oxígeno disuelto (OD) y d) temperatura con respecto al tiempo a partir del 116<sup>avo</sup> día de funcionamiento del fotobiorreactor tubular de cultivo autotrófico de microalgas nativas.



**Figura 20.** Monitoreo de los parámetros físico-químicos con respecto al tiempo de funcionamiento del fotobiorreactor tubular para el cultivo autotrófico de microalgas nativas. Leyenda: a) pH, b) conductividad ( $\blacklozenge$ ) antes y ( $\square$ ) después de cambiar el medio de cultivo, c) temperatura y d) concentración de OD en el fotobiorreactor.

En el caso del pH, el medio de cultivo que se alimentó al fotobiorreactor tubular se mantuvo entre 6 y 7. Sin embargo, el pH medido in-situ en el PBR presentó valores mucho más elevados entre 7.8 y 9.3. El aumento del pH se asocia a la síntesis de compuestos durante el metabolismo de las microalgas como la formación de fosfatos de calcio (Bermero Castillo & Vargas Machuca, 2011). Los valores de pH registrados en el presente estudio no son los ideales para el crecimiento de las microalgas, ni la síntesis de lípidos. Se tiene muy poca información del efecto del pH en el crecimiento de las microalgas y síntesis de lípidos. Sin embargo, el estudio de Moronta *et al.* de la respuesta de *Chlorella sorokiniana* al pH indica que valores ácidos de entre 1 y 3 inhiben el crecimiento; y, a valores mayores a 3 la biomasa se va incrementando con el pH, obteniendo valores máximos entre 0 y 25 ppm a pH de 7-8 (Moronta et al., 2006). Liang *et al.* también concuerdan que existe inhibición a pH menores a 4 y además indica que el valor máximo de biomasa de  $6.26 \text{ g L}^{-1}$  se obtiene a un pH de 5; mientras que el mayor rendimiento de lípidos de  $3.02 \text{ g L}^{-1}$  se obtuvo a un pH de 6.5 (Liang et al., 2011). Al comparar los valores de pH con la DO se observa que, a pesar de cambiar tanto la alimentación como la aireación en el PBR tubular, no existe un aumento de la biomasa significativo como el observado en los dos primeros meses; no se volvió a alcanzar el máximo valor registrado de 2.92 (600 nm).

En cuanto a la conductividad, los valores registrados varían entre 1000 y 2500  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . La conductividad depende de la presencia de iones; de su concentración, movilidad y valencia, y de la temperatura ambiental (Metcalf & Eddy, 2003). Debido a que la temperatura se mantiene casi constante entre 20 y 25 °C, la conductividad no varía mucho. Los cambios significativos registrados entre los valores medidos antes y después del medio se atribuyen a los cambio de mayores volúmenes de medio y cuando se tuvo problemas con el PBR. La

conductividad antes de ser agregado el medio es mayor debido a la mayor presencia de iones y disminuía una vez que se aumentaba medio. La temperatura, no sólo afecta a la conductividad. La concentración de las microalgas se puede optimizar cuando se identifica la temperatura de cultivo adecuada para el desarrollo de las microalgas (Chini Zittelli, Rodolfi, Biondi, & Tredici, 2006). La temperatura adecuada para el crecimiento de *Chlorella* es 25°C, como se menciona anteriormente. Los valores obtenidos en el PBR generalmente fueron menores a la temperatura óptima. Tan solo el 4% del tiempo total del estudio se registraron temperaturas cercanas a 25 °C.

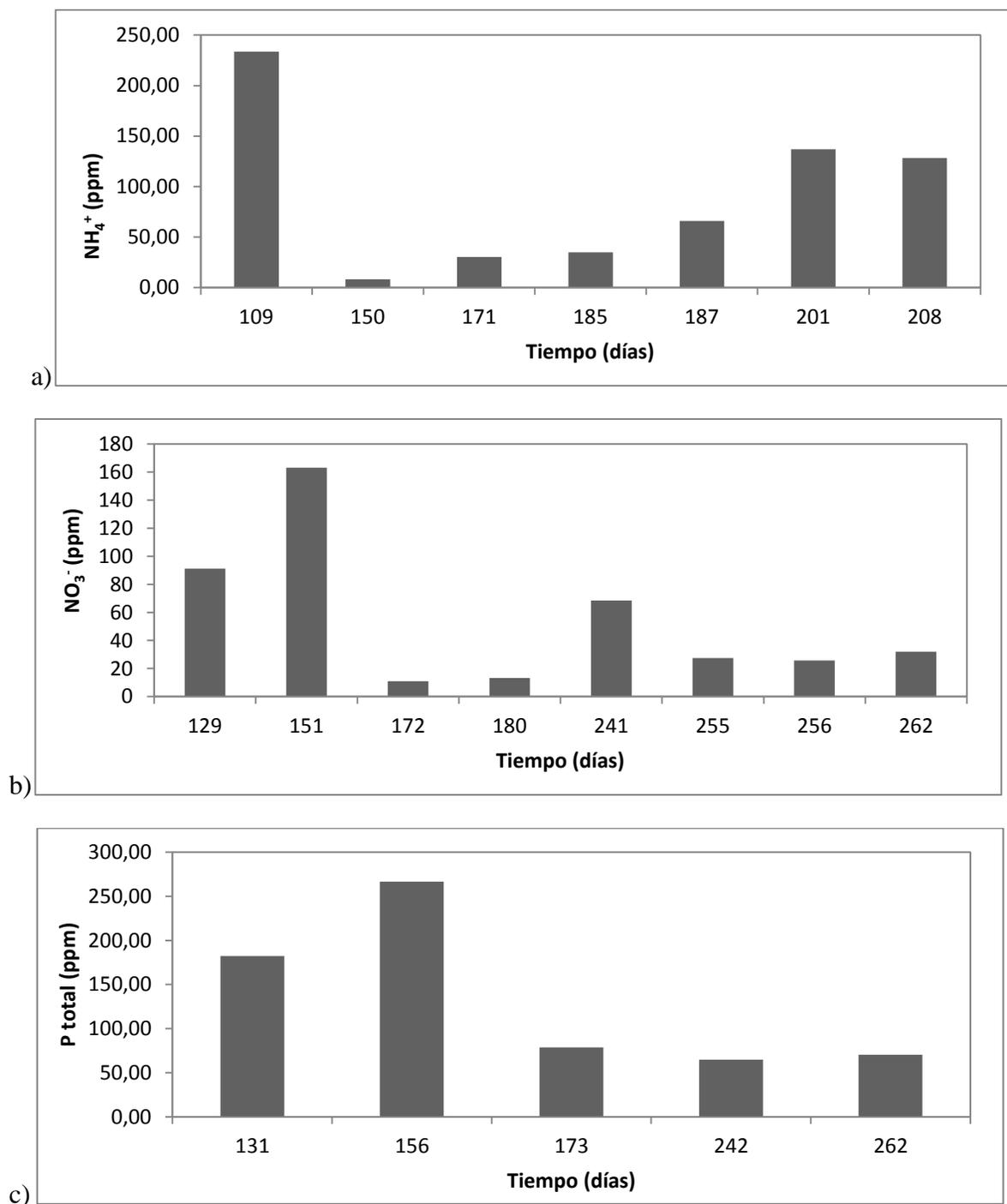
Finalmente, en cuanto a la concentración de OD en el PBR se registraron valores de entre 2.1 a 6.9 mg L<sup>-1</sup>. La media registrada es de 5 mg L<sup>-1</sup>. La concentración de oxígeno disuelto en el fotobiorreactor influye en la producción de la biomasa. Durante la fotosíntesis, se genera de oxígeno y se va acumulando en el fotobiorreactor; sin embargo, gracias a la aireación el OD es desplazado y se evita la inhibición de la fotosíntesis (Molina et al., 2001). Las altas concentraciones de OD producen un efecto adverso en la productividad de las microalgas en un PBR tubular (Acién Fernández et al., 2001). Concentraciones mayores o menores a la concentración de saturación del oxígeno, 9.2 mg L<sup>-1</sup>, producen una disminución de la productividad de la microalga *Chlorella* (Chini Zittelli et al., 2006). Estudios realizados han demostrado que para obtener una alta productividad se debe combinar una suficiente mezcla por la disponibilidad de luz y bajas concentraciones de oxígeno disuelto.

### **5.3.3. Nitrato, amonio y fosfato**

En la Figura 21 se presenta el monitoreo de nutrientes con respecto al tiempo de funcionamiento del PBR tubular para el cultivo autotrófico de microalgas nativas correspondientes a a) amonio, b) nitrato y c) fósforo total. En el presente estudio se analizaron

los nutrientes en el PBR para evaluar la degradación de los mismos y su correlación con la densidad celular y contenido de lípidos. Las microalgas presentan un rápido crecimiento, lo que muchas veces ocasiona una rápida reducción de nitrógeno del medio. Varios estudios demuestran que la deficiencia de nitrógeno es necesaria para inducir una producción de lípidos significativa (Spoehr & Milner, 1949), pero tales condiciones de cultivo afecta fuertemente la tasa de crecimiento, y por lo tanto la productividad neta (Rodolfi et al., 2009). Por otro lado, cuando hay alta disponibilidad de nitrógeno se da un proceso de desnitrificación. En el PBR, se registraron concentraciones de oxígeno disuelto muy bajas, creando condiciones casi anóxicas. Las concentraciones más bajas de nitrato concuerdan con las fechas cuando menor oxígeno disuelto se registró. Los valores más elevados de nitrato y amonio sugieren que no existió degradación del nitrógeno debido a la baja concentración de microalgas, o posibilidad de que estén enfermas; a los 109 días las microalgas se registraron los menores valores de DO alrededor de 0.85 para todas las longitudes de onda y a los 150 días el contenido del PBR se regó.

La presencia de fosfatos en el medio de cultivo, al ser uno de los nutrientes principales para el crecimiento de las microalgas, se consume con mayor rapidez que los demás nutrientes. El consumo de fosfato por parte de las microalgas aumentó en un 50% de la degradación por consumo observada en los primeros 6 meses de monitoreo del reactor. El alto contenido de lípidos está asociado a la síntesis de triacilglicerol (TAG), lípidos con alto porcentaje de ácidos grasos y ausencia de fosfato, que son ideales para la producción de biodiesel por su baja sensibilidad a la oxidación (Guschina & Harwood, 2006).



**Figura 21.** Monitoreo de nutrientes con respecto al tiempo de funcionamiento del fotobiorreactor tubular para el cultivo autotrófico de microalgas nativas. Leyenda: (♦) concentración (ppm) de a) Amonio, b) Nitrato c) Fósforo total en el tiempo.

#### 5.4. Efecto de la concentración de nutrientes en la tasa de producción de lípidos en el fotobiorreactor tubular

La cantidad de lípidos de las microalgas previa a la instalación del fotobiorreactor fue de 7.31% (Tabla 1). Luego de 60 días de monitoreo, se obtuvo un contenido de 20.23% w/w, a los 123 días el máximo valor registrado de 33.53%w/w y al final del monitoreo del fotobiorreactor día 265 el valor fue de 10.57% w/w. La productividad de lípidos en la microalga *Chlorella* sp. fue y puede seguir siendo mejorada con técnicas de cultivo que promuevan la producción de lípidos, modificando la concentración de nutrientes, la aireación y la cantidad de luz a la que están expuestas las microalgas.

Los principales nutrientes necesarios para el crecimiento de las microalgas son nitrógeno, fósforo y potasio (Abou-shanab et al., 2012). La Tabla 5 presenta la composición del medio de proteosa alimentado al PBR y del fertilizante utilizado en el experimento. Por lo tanto, el medio con fertilizante alimentado a los bioensayos consistió en la misma composición del medio de proteosa y adicionalmente los elementos enlistados del fertilizante líquido.

**Tabla 5.** Comparación de la composición del medio de proteosa y del fertilizante líquido

	<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad</b>
<b>Composición del Medio de Proteosa</b>	NaNO <sub>3</sub>	0.25	(g L <sup>-1</sup> )
	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.025	
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.075	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.075	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.175	
	NaCl	0.025	
	NaHCO <sub>3</sub>	0.1	
	Proteosa	1	
<b>Composición del fertilizante líquido</b>	N	3	%
	K	18	
	P	18	

El efecto de los nutrientes en la tasa de producción de lípidos fue evaluado en bioensayos batch de 1 L para determinar la concentración ideal de fertilizante en el medio cultivo. Los experimentos contaron con un control y 3 bioensayos con diferentes concentraciones de fertilizante. La Figura 22 indica el monitoreo de crecimiento de algas en bioensayos batch de 500 mL mediante medición de absorbancia en longitudes de onda de a) 600 nm, b) 680 nm y c) 750 nm con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y agitación a una velocidad de 50 rpm. Las curvas para todas las longitudes de onda indican claramente que el control tiene el menor crecimiento.

La Figura 23 muestra fotografías de los 4 experimentos realizados por duplicado para evaluar el efecto del fertilizante. En la fotografía superior se puede apreciar que los dos matraces erlenmeyer de color verde oscuro que están al frente al lado derecho corresponden al Control. Los dos matraces con algas de color verde claro que se encuentran en la parte central en ambas imágenes corresponden a los experimentos con una concentración de 1 mL de fertilizante  $L^{-1}$  de medio y los matraces erlenmeyer restantes corresponden a los experimentos con una concentración de 2 y 3 mL de fertilizante  $L^{-1}$  de medio, respectivamente.

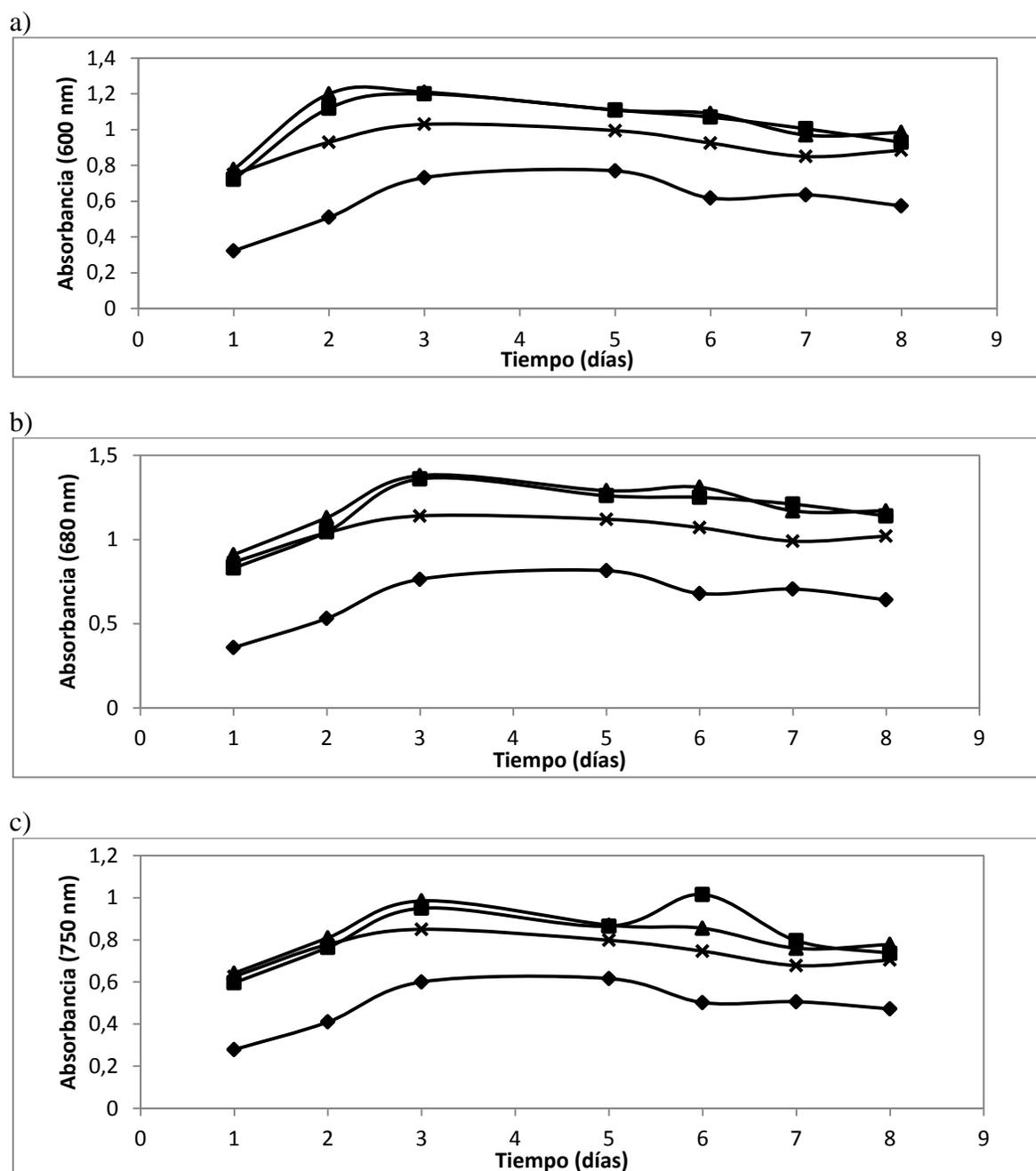
Además, se comparó la densidad celular y el contenido de lípidos en cada uno de los experimentos. En la Tabla 6 se presentan los resultados de la densidad celular ( $g L^{-1}$ ) y contenido de lípidos (% w/w) para los bioensayos del experimento del efecto del fertilizante. Evaluando los resultados se puede observar que la menor densidad celular obtenida fue de  $0.296 g L^{-1}$  y mayor contenido de lípidos, 12.138 % w/w fue para el control. Le sigue el bioensayo de 2 mL de fertilizante por litro de medio con la mayor densidad celular de todos los ensayos  $0.498 g L^{-1}$  y un contenido de lípidos de 8.517% w/w. El bioensayo con una concentración de fertilizante de 1 mL  $L^{-1}$  demuestra ser muy baja ya que la densidad celular

obtenida es la menor de los 3 experimentos. La densidad celular del tercer experimento (3 mL) es la segunda más alta con  $0.477 \text{ g L}^{-1}$ . Sin embargo, al comparar contenido de lípidos el bioensayo con 1 mL de fertilizante tiene casi el doble que el bioensayo de 3 mL. Esto se debe a que el rápido crecimiento de las microalgas hace que la disponibilidad de nitrógeno disminuya de forma rápida y una vez que se agota, el crecimiento de algas cesa (Fernández et al., 2012) y como se mencionó anteriormente la falta de N tiene un efecto positivo en la producción de lípidos. La productividad obtenida para *Chlorella sp.* en los bioensayos comparada con la obtenida de *Phaeodactylum tricorutum* indicado en la Tabla 2, es mucho menor (alrededor de 29 veces). Una concentración de 2 mL de fertilizante en el PBR ayudaría a mejorar la productividad de lípidos y biomasa ya que es el ensayo que mejor relación tiene entre la densidad celular y el contenido de lípidos extraídos.

**Tabla 6.** Densidad celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) y contenido de lípidos (% w/w) de los bioensayos del efecto del fertilizante

Experimentos	Control	1 mL	2 mL	3 mL
Densidad Celular ( $\text{g L}^{-1}$ )	0.296	0.428	0.498	0.477
Contenido de lípidos (% w/w)	12.138	10.322	8.517	5.382
Productividad de lípidos ( $\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ )	0.17	0.22	0.21	0.13

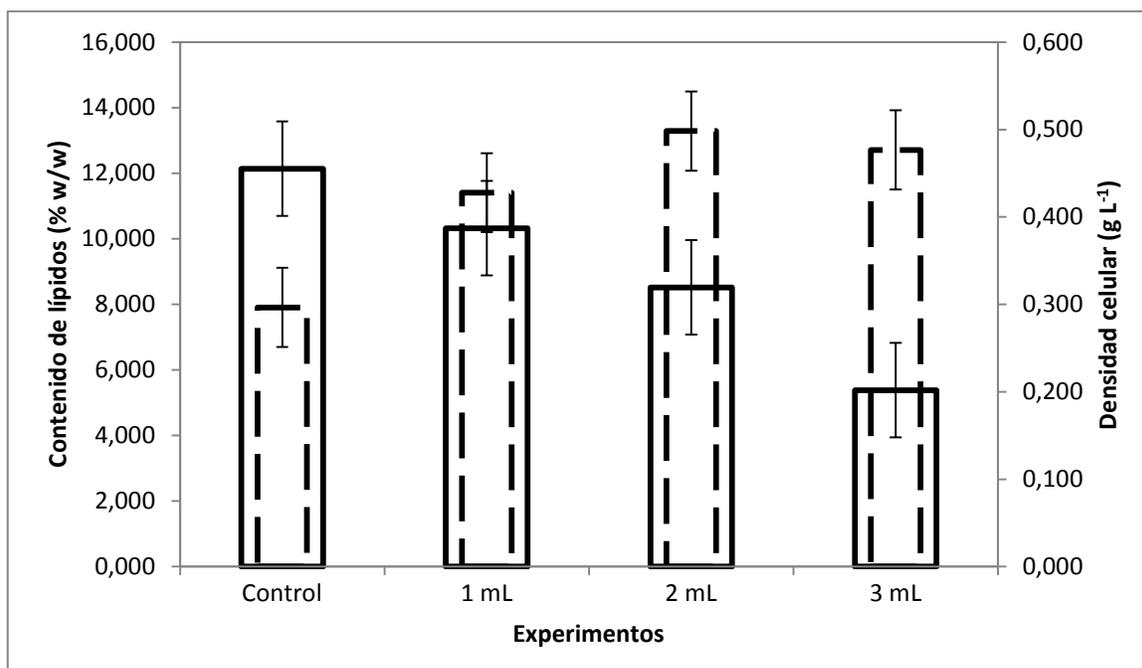
La Figura 24 indica la comparación de la densidad de algas ( $\text{g L}^{-1}$ ) y contenido de lípidos (%w/w) de la cepa nativa de microalgas *Chlorella sp.* en los bioensayos del experimento.



**Figura 22.** Monitoreo del efecto de nutrientes en crecimiento de algas en bioensayos batch de 500 mL mediante medición de absorbancia en longitud de onda de a) 600 nm, b) 680 nm y c) 750 nm, con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con lámparas OSRAM de luz fluorescente blanca fría de 20 W y agitación continua de 50 rpm mediante un agitador orbital. Legenda: (◆) Control, bioensayo con una concentración de fertilizante (■) 1 mL L<sup>-1</sup>, (▲) 2 mL L<sup>-1</sup>, (✕) 3 mL L<sup>-1</sup>



**Figura 23.** Fotografías de los bioensayos batch de 500 mL para evaluar el efecto del fertilizante en el contenido de lípidos de la microalga *Chlorella sp.* Los bioensayos se mantuvieron a 25°C, con ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad con lámparas OSRAM de luz fluorescente blanca fría de 20 W, agitación continua a 50 rpm utilizando un agitador orbital en un tiempo de cultivo de 8 días.



**Figura 24.** Evaluación de la densidad de algas ( $\text{g L}^{-1}$ ) y contenido de lípidos (%w/w) en los bioensayos con fertilizante. Leyenda: barras de línea entrecortada (densidad de algas) barras de línea continua (contenido de lípidos).

## 6. Conclusiones

La cepa de microalgas nativa *Chlorella sp.* de este estudio demostró ser la cepa indicada para montar el PBR tubular al registrar los valores más elevados de DO.

*Chlorella* alcanza contenidos de lípido en porcentaje en peso seco (% w/w) de 20 a 50% w/w y tiene un alto potencial de ser mejorada. Las condiciones de ambientales y de cultivo juegan un papel fundamental en el contenido de lípidos de las microalgas. El flujo de aire óptimo fue  $3 \text{ L min}^{-1}$  fue provisto a través de tres dispersores para asegurar una mezcla completa y evitar la sedimentación de las microalgas y el rompimiento celular. Una cosecha y cambio de medio de 200 mL diarios (2.5 % de volumen de algas) fueron empleados para mantener un crecimiento constante de las *Chlorella sp.* en el PBR. La iluminación suministrada al PBR fue una PAR de  $124.13 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . El pH ideal es de 5 a 6.5 y la temperatura óptima de  $25^\circ\text{C}$ .

El crecimiento de algas en el fotobiorreactor tubular fue monitoreado en términos de DO, densidad de algas ( $\text{g L}^{-1}$ ) y contenido de lípidos (%w/w). La DO registró valores máximos de 2.92 (600 nm), 3.51 (680 nm) y 2.49 (750 nm) a los 66 días de instalado el PBR. La cepa creció exponencialmente a una tasa de  $0.034 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La densidad de algas obtenida varió entre 0.04 y  $1.45 \text{ g L}^{-1}$  y el mayor contenido de lípidos obtenido inicialmente fue de 20.23%w/w. Gracias a la instalación de dispersores se obtuvo un contenido de lípidos de 33.53 %w/w.

El fertilizante tiene un efecto de potencializar el crecimiento de las microalgas, sin embargo, tiene un efecto adverso en el contenido de lípidos. Una concentración de  $2 \text{ mL L}^{-1}$  fertilizante indicó mejores valores de densidad y de contenido de lípidos.

## 7. Recomendaciones

Las condiciones de operación del reactor se analizaron brevemente en este estudio, se recomienda realizar estudios más profundos del efecto de la iluminación, aireación y pH en el PBR.

Las microalgas al crecer se van acumulando alrededor de los dispersores, para asegurar una mezcla continua se debe realizar un mantenimiento continuo de los mismos. Para destaparlos se sumerge a los dispersores en agua destilada tibia por aproximadamente 1 minuto.

La principal fuente de carbono de las microalgas fue provista por la concentración  $0.10 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$ , sin embargo numerosos estudios indican el efecto positivo de la captación de  $\text{CO}_2$  de las microalgas en la productividad de la biomasa y de lípidos. En futuros proyectos, estudiar concentraciones de 5% de  $\text{CO}_2$  en la alimentación de aire en el PBR que ayudaran a bajar el pH, aumentar el crecimiento de las microalgas y el contenido de lípidos.

Realizar cosechas diarias de 2.5% del volumen del medio para asegurar un crecimiento continuo de microalgas en el PBR.

Utilizar medio con fertilizante líquido a una concentración de  $2 \text{ mL L}^{-1}$  para algas enfermas hasta alcanzar la tasa máxima de biomasa ( $0.047 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) y volver al medio con proteosa.

## 8. Bibliografía

- Abdelaziz, A. E. M., Leite, G. B., & Hallenbeck, P. C. (2013). Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply. *Environmental Technology*, *34*(May 2014), 1783–805. doi:10.1080/09593330.2013.827748
- Abou-shanab, R. A. I., Raghavulu, S. V., Hassanin, N. M. A., Kim, S., Kim, Y. J., Oh, S. U., ... Jeon, B. (2012). Manipulating nutrient composition of microalgal growth media to improve biomass yield and lipid content of *Micractinium pusillum*, *11*(96), 16270–16276. doi:10.5897/AJB12.2628
- Acién Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M., Sánchez Pérez, J. A., Molina Grima, E., & Chisti, Y. (2001). Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. *Chemical Engineering Science*, *56*(8), 2721–2732. doi:10.1016/S0009-2509(00)00521-2
- Ahmed, S., Jaber, A., Dixon, R., Eckhart, M., Thompson, G., & Hales, D. (2012). RenewableS 2012 GLOBAL STATUS REPORT 2012.
- Álvarez, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *359*, 63–89. Retrieved from [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IQ\\_biocombustibles\\_4a\\_generacion\\_25608.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IQ_biocombustibles_4a_generacion_25608.pdf)
- APHA, AWWA, & WEF. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (22nd ed.). Washington, DC. doi:20001-3710
- Asociación Nacional de Electroquímica. (2012). Cloro como desinfectante. *Euro Chlor*. Retrieved March 12, 2015, from <http://www.cloro.info/que-es-el-cloro/cloro-como-desinfectante>
- Beer, L. L., Boyd, E. S., Peters, J. W., & Posewitz, M. C. (2009). Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*, 264–271. doi:10.1016/j.copbio.2009.06.002
- Bermero Castillo, L. E., & Vargas Machuca, J. A. (2011). Estudio Del Cosechado De Cultivos De Microalgas En Agua Residual Mediante Técnicas De Centrifugado, *54*.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 557–577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009
- Brower, M., Green, D., Hinrichs-rahlwes, R., Sawyer, S., Sander, M., Taylor, R., ... Hales, D. (2014). *Renewables 2014: Global status report. REN 21 Steering Committee*.
- Castillo, R. (2013). Caña de Azúcar: Cultivo para la sostenibilidad. *CINCAE / Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador*. Retrieved from <http://cincae.org>
- Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2006). Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, *261*(3), 932–943. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.08.011

- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- 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. doi:10.1002/elsc.200800113
- Chu, W. (2012). Biotechnological applications of microalgae. *International E-JOURNAL of Science, Medicine & Education*, 6(126), 24–37.
- Dávila Gavilanes, A. G. (2013). *Evaluación de las Condiciones de Cultivo Autotrófico de Microalgas Chlorella para la Producción de Biodiesel*. Universidad San Francisco de Quito. Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2404/1/107095.pdf>
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49(8), 2106–2116. doi:10.1016/j.enconman.2008.02.020
- Deng, X., Fei, X., & Li, Y. (2011). The effects of nutritional restriction on neutral lipid accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(3), 260–270. doi:10.5897/AJMR10.557
- Dewulf, J., & Van Langenhove, H. (2006). *Renewables-based technology: sustainability assessment*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Dischinger, S. (2012). *Development of Sustainable Algal Growth for Biofuel in Ecuador*. University of Arizona.
- Eliasson, B., Riemer, P., & Wokaun, A. (1999). *Greenhouse Gas Control Technologies*. Elsevier. Retrieved from [https://books.google.com/books?id=B-DS4P\\_J8KUC&pgis=1](https://books.google.com/books?id=B-DS4P_J8KUC&pgis=1)
- FAO. (2008). *The state of food and agriculture 2008 - BIOFUELS: prospects, risks and opportunities*. Roma. Retrieved from <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100e/i0100e.pdf>
- Fernández, L., Montiel, J., Millán, A., & Badillo, J. (2012). Producción de Biocombustibles a partir de Microalgas. *Ra Ximhai*.
- 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*.
- Frac, M., Jezierska-tys, S., & Tys, J. (2010). Microalgae for biofuels production and environmental applications : A review, 9(54), 9227–9236.
- Goldman, J. C. (1979). Outdoor algal mass cultures—II. Photosynthetic yield limitations. *Water Research*, 13(2), 119–136. doi:10.1016/0043-1354(79)90083-6
- Gouveia, L. (2011). *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-17997-6

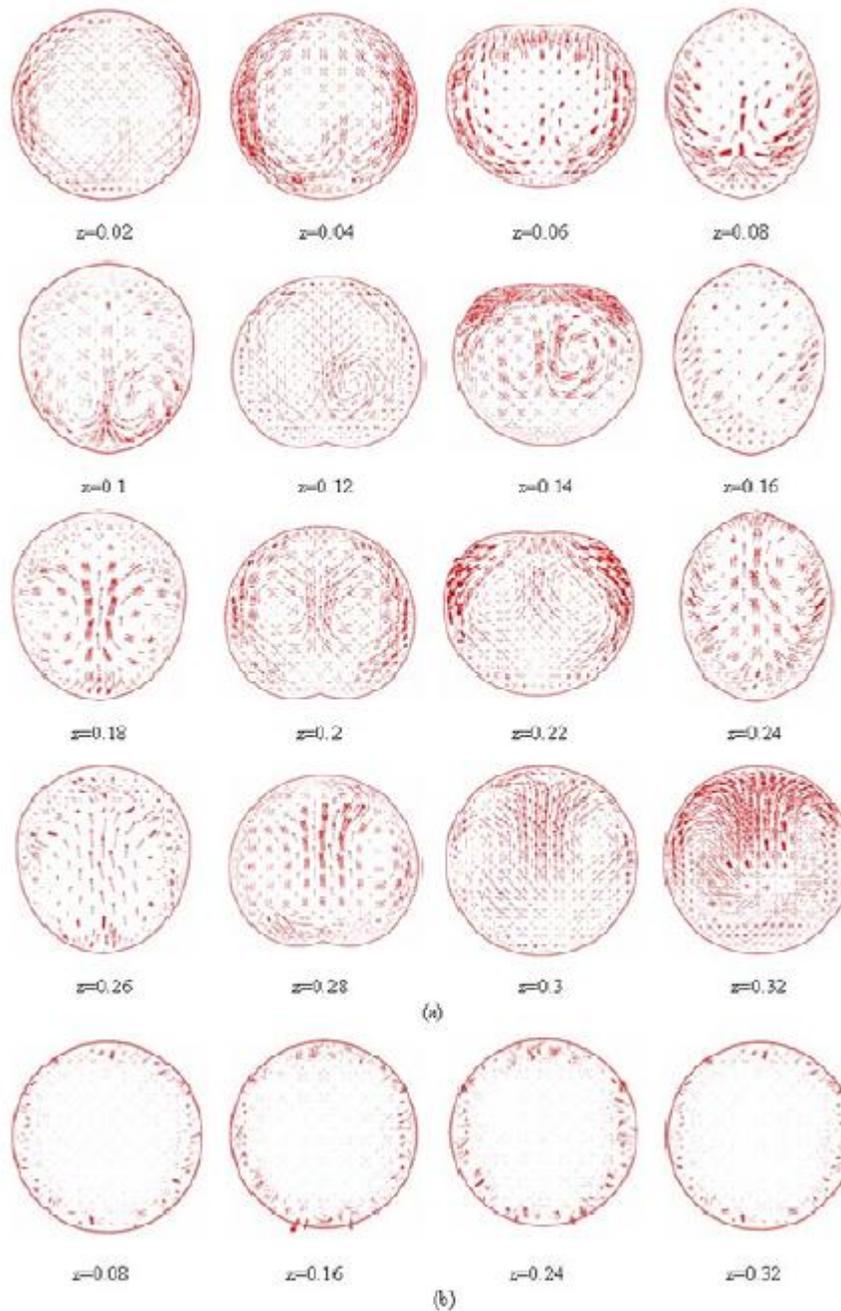
- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 269–74. doi:10.1007/s10295-008-0495-6
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45(2), 160–86. doi:10.1016/j.plipres.2006.01.001
- IEA. (2013). World Energy Statistics and Balances data service. Retrieved March 25, 2015, from <http://www.iea.org/Sankey/index.html#c=World&s=Balance>
- IPCC. (2014). *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., & Pavasant, P. (2007). Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, 98(2), 288–95. doi:10.1016/j.biortech.2006.01.011
- Kumar, P., Suseela, M. R., & Toppo, K. (2011). Physico-Chemical Characterization of Algal oil : a Potential Biofuel. *Society of Applied Sciences*, 2(3), 493–497.
- Lee, Y., & Shen, H. (2004). Basic culturing techniques. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 40–56). Blackwell Publishing.
- Li, Y., Chen, Y.-F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., ... Ruan, R. (2011). Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(8), 5138–44. doi:10.1016/j.biortech.2011.01.091
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 629–636. doi:10.1007/s00253-008-1681-1
- Liang, G., Mo, Y., Tang, J., & Zhou, Q. (2011). Improve lipid production by pH shifted-strategy in batch culture of *Chlorella protothecoides*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(28), 5030–5038. doi:10.5897/AJMR11.720
- Mata, T. M., Martins, A. a., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020
- Mcginn, D., Green, D., Hinrichs-rahlwes, R., Sawyer, S., Sander, M., Taylor, R., ... Hales, D. (2013). *RenewableS 2013 GLOBAL STATUS REPORT 2013*.
- Merchuk, J. C., Ronen, M., Giris, S., & Arad, S. (1998). Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium* sp. *Biotechnology and Bioengineering*, 59(6), 705–713. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19980920)59:6<705::AID-BIT7>3.0.CO;2-J

- Metcalf, & Eddy. (2003). *Wastewater engineering: Treatment and reuse* (4th ed.). Boston: McGraw-Hill.
- Ministerio de Energía y Minas. (2008). Perspectivas para la producción y uso de biocombustibles en Ecuador. *Proyectos Hidrocarburos*. Retrieved February 20, 2015, from [www.minasypetroleos.gov.ec](http://www.minasypetroleos.gov.ec)
- Molina, E., Fernández, J., Acién, F. G., & Chisti, Y. (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, *92*(2), 113–131. doi:10.1016/S0168-1656(01)00353-4
- Molina Grima, E., Fernández, F. G. A., García Camacho, F., & Chisti, Y. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*, *70*(1-3), 231–247. doi:10.1016/S0168-1656(99)00078-4
- Moronta, R., Mora, R., & Morales<sup>1</sup>, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de La Facultad de Agronomía*, *23*(1), 28–43. Retrieved from [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182006000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182006000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Muthukumar, A., Elayaraja, S., Ajithkumar, T. T., Kumaresan, S., & Balasubramanian, T. (2012). Biodiesel production from marine microalgae *Chlorella marina* and *Nannochloropsis salina*. *Petroleum Technology and Alternative Fuels*, *3*(5), 58–62. doi:10.5897/JPTAF12.010
- Parra Narváez, R. (2011). Cumbre de Río de Janeiro RESUMEN DE LA AGENDA 21, 1–28.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., & Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, *102*(1), 100–112. doi:10.1002/bit.22033
- Salih, F. M., Haase, R. A., Companies, C., & Land, S. (2012). Potentials of microalgal biofuel production. *Petroleum Technology and Alternative Fuels*, *3*(January), 1–4. doi:10.5897/JPTAF11.029
- Scragg, a. H., Illman, a. M., Carden, a., & Shales, S. W. (2002). Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, *23*, 67–73. doi:10.1016/S0961-9534(02)00028-4
- Spoehr, H. A., & Milner, H. W. (1949). THE CHEMICAL COMPOSITION OF CHLORELLA; EFFECT OF ENVIRONMENTAL CONDITIONS. *Plant Physiology*, *24*(1), 120–49. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=437916&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sueoka, N. (1960). MITOTIC REPLICATION OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID IN CHLAMYDOMONAS REINHARDI. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *46*(1), 83–91. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/46/1/83.short>

- Tschirley, J. (2009). Algae-based Biofuels: A review of challenges and opportunities for Developing Countries. *EABA 1st General Assembly and Conference*, (May), 1–9. doi:10.1016/j.envsci.2008.10.002
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10), 4021–8. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.046
- UTEX. (n.d.-a). Bristol Medium. *UTEX The Culture Collection of Algae*. Retrieved October 12, 2014, from <http://web.biosci.utexas.edu/utex/mediaDetail.aspx?mediaID=29>
- UTEX. (n.d.-b). Proteose Medium. *UTEX The Culture Collection of Algae*. Retrieved October 12, 2014, from <http://web.biosci.utexas.edu/utex/mediaDetail.aspx?mediaID=65>
- Wahlen, B. D., Morgan, M. R., Mccurdy, A. T., Willis, R. M., Morgan, M. D., Dye, D. J., ... Seefeldt, L. C. (2013). Biodiesel from Microalgae, Yeast, and Bacteria: Engine Performance and Exhaust Emissions. *Energy & Fuels*, (27), 220–228. doi:dx.doi.org/10.1021/ef3012382
- Wu, L. B., Li, Z., & Song, Y. Z. (2009). Numerical investigation of flow characteristics and irradiance history in a novel photobioreactor. *African Journal of Biotechnology*, 8(18), 4672–4679. doi:10.5897/AJB09.700
- Wu, X., & Merchuk, J. C. (2001). A model integrating fluid dynamics in photosynthesis and photoinhibition processes. *Chemical Engineering Science*, 56(11), 3527–3538. doi:10.1016/S0009-2509(01)00048-3
- Zheng, Y., Chen, Z., Lu, H., & Zhang, and W. (2011). Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by *Tetraselmis subcordiformis* in a rectangular airlift photobioreactor. *African Journal of Biotechnology*, 10(10), 1888–1901. doi:10.5897/AJB10.1620

## 9. Anexos

### Anexo 1



**Figura 25.** Evolución de la estructura del flujo en diferentes cortes transversales de los PBRs: (a) para un PBR espiral; (b) para un PBR tubular. Fuente: (L. B. Wu et al., 2009)

