

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MICROALGAS CLOROFITAS EN SISTEMA RACEWAYS Y FOTOBIOREACTORES EN COLUMNA PARA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA.

B.M. JOCSAN AXEL FALCÓN VALDÉS

Dirección de Tesis.

M. en C. MÓNICA RODRÍGUEZ PALACIO
Laboratorio de Ficología Aplicada UAM-I

Co-Director. Dr. RICARDO VÁZQUEZ PERALES
Universidad Iberoamericana - Puebla

México, D.F.

NOVIEMBRE, 2012.

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

COMITÉ TUTORAL:



M. en B. Mónica Cristina Rodríguez Palacio
Laboratorio de Ficología Aplicada, UAM-I



Dr. Ricardo Vázquez Perales
Programa Interdisciplinario del Medio Ambiente, UIA Puebla

LECTOR DE TESIS:



M. en C. Cruz Lozano Ramírez
Laboratorio de Ficología Aplicada, UAM-I

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la M. en C. Mónica Rodríguez Palacio y el Dr. Ricardo Vázquez Perales, en la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa, México D. F.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento de la Fundación Produce Puebla A.C. mediante el Proyecto “PRODUCCIÓN DE MICROALGAS PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITES Y OTROS DERIVADOS, EVALUANDO DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN EN ESTANQUES Y REACTORES DE COLUMNAS”, de quien fue responsable el Dr. Ricardo Vázquez Perales.

DEDICATORIA

Con todo cariño dedico esta tesis:

A mis padres, *Ana Luisa Valdés de Falcón* y *José Juan Falcón Isunza* a quienes debo mucho por cuanto he alcanzado, por su ejemplo, apoyo, entendimiento, y amor incondicional.

Reconociéndoles también su espíritu de fraternidad siempre patente y el esfuerzo plasmado en cada uno de nosotros, sus mocosos; para ser día a día mejores personas, por siempre *GRACIAS!!*.

A mis hermanas Joanna, Lizbeth y Zaira Falcón Valdés; por ser ese trío de ángeles; que han estado conmigo para compartir mi desarrollo y crecimiento; y quienes me han impresionado con su madurez y actitud ante la vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a mis directores de tesis, a la M. en B. Mónica Rodríguez Palacio por permitirme la oportunidad de realizar este trabajo, mi sincero agradecimiento por su dirección académica, por su confianza y paciencia. De igual manera al Dr. Ricardo Vázquez Perales, por darme la oportunidad de formar parte del primer grupo de investigación en Microalgas de la Universidad Iberoamericana en Puebla, por su apoyo, objetividad y dirección en mi investigación.

A ustedes que fueron las columnas de este trabajo... GRACIAS!!

Extiendo el agradecimiento a mis compañeros de Laboratorio de Biomasa Microalgal y Vegetal (J-010) de la Ibero-Puebla, Claudia A. y Diego V. con quienes me desvelé y mal-comí por sacar adelante el Proyecto de Planta Piloto de Investigación en Microalgas (PPIMA) que se desarrolló exitosamente y en el cuál se desenvolvieron nuestras Tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Hidrobiología de la UAM-I (AS-202), Lolita, Lili, Pinita, Gerardo, Alberto y a Mabel a todos ellos por su ayuda y apoyo en la realización del trabajo experimental; agradezco también por su asistencia y sugerencias a Oscar y Beto del Laboratorio de Química de la Ibero-Puebla.

El logro obtenido con este trabajo no es solamente mío, se los debo a todos y cada una de las personas que me ayudaron anímica y académicamente a cumplirlo y que con su apoyo se hizo posible el termino de esta etapa.
¡Mil gracias a todos!

RESUMEN

Las microalgas como grupo de organismos representan uno de los recursos bioenergéticos más prometedores, por ello es importante conocer y entender su dinámica de crecimiento y comportamiento, ya que su rango de aplicaciones va desde la producción de biomasa para alimento vivo, hasta su uso en biotecnología para la obtención de bioenergéticos, productos y constituyentes de valor agregado. El uso de las microalgas para la producción de biodiesel es una opción que parece ser favorable, debido a su elevado contenido de lípidos, elevada eficiencia fotosintética y su alta velocidad de crecimiento. *Chlorella vulgaris* y *Desmodesmus quadricauda* son microalgas cosmopolitas, cuyo contenido lipídico llega a ser elevado y adecuado para la producción de biodiesel. En el presente proyecto se evaluaron sistemas de cultivo en columna (fotobiorreactores) y en estanques tipo carrusel (raceways), en una planta piloto experimental, para analizar su producción y calidad de la biomasa obtenida como fuente de aceites para la producción de biodiesel.

Se comparó el crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* y *Desmodesmus quadricauda* en fase exponencial y estacionaria, obteniendo tasas de crecimiento más elevadas para sistemas fotobiorreactores con *D. quadricauda* de 2.1 por día, obteniendo un máximo de 7.7×10^6 cel/mL y en el caso de *C. vulgaris* la tasa máxima de crecimiento fue 1.4 por día con 6.9×10^6 cel/mL. En raceways, para *D. quadricauda* se obtuvo un máximo de células en sistemas de 300L de 15×10^6 cel/mL y de 8.9×10^6 cel/mL en sistemas de 3,000 L. Para *C. vulgaris* se registró 1.5×10^6 cel/mL en sistemas de 300 L. Con biomasa del cultivo de 3,000 L de *D. quadricauda* se valoraron tres métodos para la obtención de la fracción lipídica en mayor escala, obteniendo una extracción de 3.19% con el método de Goldfish, 2.38% para Rose-Glotier y 13.13% en Soxhlet, siendo este último el de mayor rendimiento.

En el caso del perfil bioquímico se comparó la cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos para conocer la calidad de biomasa obtenida, en cultivos de *C. vulgaris* las proporciones en proteínas fueron 23-26%, carbohidratos 12% y lípidos 4.1-5.8%, mientras que *D. quadricauda* presentó mayores variaciones: 8-25% en proteínas, 9.6-18.8% en carbohidratos y 1.8-4.3% de lípidos con respecto al peso seco total.

Los sistemas más eficientes para producción de biomasa algal fueron los fotobiorreactores y de las especies en estudio *D. quadricauda* presentó mayores concentraciones celulares en comparación con *C. vulgaris*, en el mismo tiempo de cultivo; por lo que representa una mejor opción para cultivos a gran escala y obtener algunos bioproductos de interés comercial.

ÍNDICE.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS	ii
COMITÉ TUTORIAL	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN	vii
INDICE	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xi
ABREVIATURAS	xii
1 INTRODUCCIÓN	
1.1. Microalgas	1
1.1.1. Generalidades.	1
1.1.2. Importancia natural.	1
1.1.3. Importancia biotecnológica.	2
1.1.4. Composición bioquímica microalgal.	4
1.1.5. Lípidos en microalgas.	4
1.1.6. Principales grupos de microalgas que producen aceite.	5
1.2. Biocombustibles	
1.2.1. Perspectiva histórica.	5
1.2.2. Clasificación de los biocombustibles.	6
1.2.3. Biodiesel.	7
1.2.4. Microalgas como bioenergético.	8
1.2.5. Sistemas de producción microalgal.	9
1.2.6. Ventajas y desventajas.	10
1.2.6.1. Sistemas abiertos – Raceway.	10
1.2.6.2. Sistema cerrado – Fotobiorreactor.	11
1.2.7. Recuperación de biomasa – Cosecha.	12
1.3. Antecedentes	12
2 JUSTIFICACIÓN	17
3 OBJETIVO	17
3.1. Objetivos específicos	
4 METODOLOGÍA	17
4.1. Cultivo batch de las microalgas <i>Desmodesmus</i> <i>quadricauda</i> y <i>Chlorella vulgaris</i>	18
4.1.1. Microalgas.	18
4.1.2. Medios y condiciones de cultivo.	18
4.1.3. Monitoreo de crecimiento.	19
4.1.3.1. Conteo celular.	19

4.1.3.2. Medición de parámetros.	20
4.1.4. Escalamiento.	20
4.1.4.1. Preparación de sistemas de cultivo.	20
4.2. Siembra	21
4.3. Cosecha	22
4.4. Análisis de composición bioquímica	22
4.5. Obtención de extracto lipídico para biodiesel	23
4.5.1. Método Goldfish (AOAC, 1990).	24
4.5.2. Método Röse-Gottlieb (AOAC, 1990).	24
4.5.3. Método Reflujo, basado en el método Soxhlet (AOAC, 1990).	25
5 RESULTADOS	26
5.1. <i>Desmodesmus quadricauda</i>	26
5.1.1. Parámetros de cultivo.	26
5.1.2. Tasas de crecimiento celular.	29
5.2. <i>Chlorella vulgaris</i>	30
5.2.1. Parámetros de cultivo.	30
5.2.2. Tasas de crecimiento celular.	32
5.3. Calidad de la biomasa algal.	33
5.4. Métodos de extracción de lípidos.	35
6 DISCUSIÓN	35
6.1. Dinámica del crecimiento celular.	35
6.2. Perfil bioquímico.	37
6.3. Extracción de lípidos.	38
7 CONCLUSIONES	38
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Biorreactores.	18
2	Diagrama de cámara Neubauer de 9mm ² .	19
3	Generación de inóculo.	20
4	Sistemas de cultivo.	22
5	Obtención de biomasa para biodiesel.	23
6	Extracción de lípidos por el método Goldfish.	24
7	Extracción por el método Röse-Gottlieb.	25
8	Extracción de lípidos por el método de Reflujo.	25
9	Curva de crecimiento celular de <i>Desmodesmus quadricauda</i> y <i>Chlorella vulgaris</i> .	27
10	Cultivo <i>D. quadricauda</i> en fotobiorreactores de 70L.	27
11	Cultivo de <i>D. quadricauda</i> en raceways de 300L.	27
12	Cultivo de <i>D. quadricauda</i> en raceways de 3000L.	28
13	Tasa y curva de crecimiento celular de <i>D. quadricauda</i> en biorreactores de 75 L, raceway 300L y raceway 3000L.	30
14	Cultivo <i>Chlorella vulgaris</i> en fotobiorreactores de 70L.	31
15	Contaminación por ciliados en cultivos raceways de <i>Chlorella vulgaris</i> .	31
16	Cultivo <i>Chlorella vulgaris</i> en raceways de 300L.	32
17	Tasa y curva de crecimiento celular de <i>C. vulgaris</i> en biorreactores de 75 L y en raceway 300L.	33
18	Curvas de calibración	34
Anexo 1	Usos y productos de las microalgas	46

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
I	Productos de microalgas.	3
II	Contenido lipídico de algunas microalgas que producen aceite.	5
III	Clasificación de biocombustibles basado en su tecnología de producción.	7
IV	Comparación de algunas fuentes de biodiesel.	9
V	Ventajas y desventajas de las lagunas abiertas y los fotobiorreactores para la producción de biomasa algal.	11
VI	Principales trabajos de obtención de lípidos para biodiesel a partir de microalgas.	13
VII	Concentraciones de Hipoclorito de Sodio y Tiosulfato de Sodio necesarios para los diferentes volúmenes de cultivo.	21
VIII	Sistemas de cultivo, capacidades y volúmenes.	21
IX	Densidades celulares por sistema de cultivo <i>D. quadricauda</i> .	28
X	Tasas de crecimiento celular, <i>Desmodesmus quadricauda</i> .	29
XI	Densidades celulares por sistema de cultivo <i>C. vulgaris</i>	30
XII	Tasa de crecimiento celular, <i>Chlorella vulgaris</i>	32
XIII	Cantidad porcentual de proteínas, carbohidratos y lípidos de <i>Chlorella vulgaris</i> .	33
XIV	Cantidad porcentual de proteínas, carbohidratos y lípidos de <i>Desmodesmus quadricauda</i> .	34
XV	Eficiencia de los métodos de extracción de lípidos para biodiesel.	35

ABREVIATURAS

μE	Microeinstein
μL	Microlitros
Abs	Absorbancia (nanómetros)
ASB	Albúmina sérica bovina (BSA)
ASP	Programa de Especies Acuáticas (Aquatic Species Program)
BCG	Biocombustibles de cuarta generación
BPG	Biocombustibles de primera generación
BSG	Biocombustibles de segunda generación
BTG	Biocombustibles de tercera generación
cel/mL	Células por mililitro
Cl-a	Clorofila a
FBR	Fotobiorreactor
FBRs	Fotobiorreactores
g/L	Gramos por litro
$\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$	Gramos por metro cuadrado por día
h	Hora (s)
L	Litro (s)
LA	Lagunas abiertas
lbs	Libras
LOATs	Lagunas de oxidación de alta tasa
mg/L	Miligramo por litro
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	nanometros
ODppm	Oxígeno disuelto en partes por millón
pH	Potencial de Hidrógeno
PPIMA	Planta piloto de investigación en microalgas
Rpm	Revoluciones por minuto
RWc	Raceway chico 300L
RWg	Raceway grande 3,000L
Ton	Tonelada(s)

1 INTRODUCCIÓN

1.1. Microalgas

1.1.1. Generalidades

Las microalgas constituyen un grupo diverso de microorganismos eucarióticos que presentan un amplio espectro de formas y tamaños (aprox. de 1µm - 20µm); tienen pigmentos fotosintéticos como clorofila (a, b y c) y carotenos, donde llevan a cabo fotosíntesis oxigénica. Su forma de vida puede ser unicelular o colonial, (Madigan *et al.*, 2004). Son microorganismos que se encuentran en casi todos los cuerpos de agua del planeta y son responsables de más de la mitad de la actividad fotosintética del mundo (Berg *et al.*, 2002). Son consideradas como objeto de estudio científico debido a su amplia distribución, su diversidad taxonómica y características bioquímicas, a su vez son de interés comercial debido a su potencial como fuente alimenticia, aplicaciones en biorremediación ambiental y como materia prima de biocombustibles de tercera y cuarta generación (Sheehan *et al.*, 1998; Demirbas y Demirbas; 2010).

En la actualidad se estima que hay identificadas más de 40,000 especies de microalgas y de estas, muy pocas especies poseen una alta versatilidad de adecuación; es decir, que bajo distintas condiciones de cultivo algunas especies presentan una alta plasticidad metabólica que permite la adaptación de dicha especie, a una amplia gama de condiciones ambientales, las que podrían considerarse una gran herramienta biotecnológica industrial para la obtención de productos de valor agregado, como lo es la producción de biocombustibles (Sheehan *et al.*, 1998; Demirbas y Demirbas; 2010).

1.1.2. Importancia natural

La relevancia de las microalgas en el medio natural radica principalmente en su importancia como el primer eslabón de la cadena trófica, siendo productores primarios y la base del flujo energético en aguas oceánicas y continentales. La productividad primaria de los océanos dentro de los procesos biogeoquímicos, es un proceso de dos etapas: fotosíntesis y biosíntesis, que genera la fijación o secuestro de carbono de la atmósfera; esta fijación de carbono inorgánico puede ser medida con el uso de isótopos radiactivos como ¹³C, permitiendo comprender la función del fitoplancton en la bomba de carbono que reduce el CO₂ atmosférico (Edding *et al.*, 2006).

Las microalgas en aguas eutróficas forman asociaciones con otros microorganismos constituyendo una red microbiana que regula el reciclaje de nutrientes, integrando los nitratos, fosfatos y carbono *in situ*, aumentando así la productividad biológica del ecosistema y su transferencia a los niveles tróficos superiores o su sedimentación hacia aguas más profundas (Delgado y Marín, 2006; Montecino y Pizarro, 2006).

La capacidad de estos microorganismos de convertir la energía luminosa en energía química fue un cambio evolutivo importante (Berg *et al.*, 2002) y

actualmente resultan ser uno de los grupos más eficientes en utilizar la energía solar en comparación con las plantas terrestres. Por lo general, las plantas superiores tienen una eficiencia fotosintética alrededor del 2% o menos; las microalgas, gracias a su simplicidad estructural y metabolismo tienen una eficacia fotosintética claramente superior que según las condiciones ambientales y de cultivo pueden alcanzar hasta 4-8% (Edding *et al.*, 2006).

Así también, las microalgas son importantes indicadores de salud de un ecosistema, ya que responden rápidamente a los cambios (físicos, químicos o biológicos) que se producen en el medio. De igual manera, sirven para evaluar la cantidad de químicos presentes en un sitio marino o acuático determinado (insecticidas, efluentes con metales pesados, desechos radioactivos, pruebas atómicas) y el aumento en concentración de cierto isótopo pesado a lo largo de los eslabones de una cadena trófica, puede llegar a depredadores superiores (peces y aves) y afectar la formación el desarrollo ontogénico, disminuyendo tasas de natalidad y provocando mortandad (Illana, 2008).

1.1.3. Importancia biotecnológica

Las microalgas también son capaces de producir diversos compuestos y productos bioquímicos originados de su metabolismo celular, llamados metabolitos primarios y secundarios; los primarios son compuestos indispensables para sus funciones vitales del organismo, a diferencia de los secundarios que se supone no son indispensables para las funciones vitales. Se sabe que los precursores específicos para la biosíntesis de los metabolitos secundarios, se obtienen por modificación de metabolitos primarios y se ha visto que este tipo de compuestos cumplen un rol ecológico mediando la interacción de la microalga con su ambiente, en respuesta a algún evento externo a las células microalgales que genere estrés celular, como lo sería la competencia intra e interespecífica, depredación, exposición a condiciones extremas de salinidad, temperatura, irradiancia y deficiencia de nutrientes (Rosales-Loaiza, *et al.*, 2008). Un ejemplo de esto es el reportado en algas marinas por Hay y Fenical (1992), donde los metabolitos secundarios crean condiciones necesarias para evitar ataques de otros organismos; los resultados mostrados en este trabajo estuvieron sujetos a las variaciones ecológicas del medio y a la diferente disponibilidad de los nutrientes, lo que determina también los cambios en el epifitismo y en la aparición de metabolitos secundarios como defensa química; a esto es necesario añadir que los organismos no disponen de un sistema inmunológico celular sino químico (Valdés-Iglesias *et al.*, 2010).

Para el hombre estos metabolitos secundarios son de especial importancia porque exhiben aplicaciones bioquímicas y por lo tanto comerciales, como antioxidantes, nutraceuticos, fragancias, saborizantes, antibióticos, bio-toxinas, alcaloides, giberelinas, bromofenoles, colorantes siendo por lo general compuestos lipídicos (Suárez-Gómez, 2004; Foley y Moore, 2005).

Por ser organismos unicelulares cultivados en medios y sistemas controlados flexibles en su manejo, la biomasa entera de las microalgas puede ser recuperada y aprovechada, a diferencia de las plantas superiores en las que los cultivos requieren una superficie de producción considerable y sus productos recuperables se encuentran en sitios u órganos específicos (como semillas), lo que dificulta su recolección y posterior extracción. Debido a esto, la inducción fisiológica para la producción de compuestos de interés comerciales como proteínas, glicerol, pigmentos, enzimas y biopolímeros es en comparación más viable con microalgas (Cohen, 1986; Romero y Suárez., 2001; Richmond, 2004; Derner *et al.*, 2006). Además estas pueden ser utilizadas para biorremediación (Maestrini *et al.*, 1984; Joseph y Joseph, 2001; Peña *et al.*, 2004; Chisti, 2007) y como biofertilizantes fijadores de nitrógeno (Cano *et al.*, 1993; Prosperi *et al.*, 1993; Olvera-Ramírez y García, 1994; Zaccaro *et al.*, 1999).

Tabla I. Productos obtenidos a partir de cultivos de microalgas (Barbosa, 2003).

	Producto	Aplicaciones
Biomasa total	- Biomasa	- Nutraceutico - Alimentos funcionales - Acuacultura - Acondicionador de suelo - Complementos alimenticios
Sustancias colorantes y Antioxidantes	- Xantofilos (astaxantina) - Luteína - β -caroteno - Vitamina C y E	- Alimentos y complementos alimenticios - Cosméticos
Ácidos grasos	- A. Araquidónico (AA) - A. Eicosapentaenoico (EPA) - A. Docosahexaenoico(DHA) - A. γ -Linolénico(GCA) - A. Linolénico. (LA)	- Nutraceutico - Alimentos y complementos
Enzimas	- Superoxidodismutasa SOD - Fosfoglicerato quinasa PGK - Luciferasa y luciferina - Enzimas de restricción	- Nutraceutico - Investigación - Medicina
Polímeros	- Polisacáridos - Almidón - Poli- β -hidroxibutirico. PHB	- Complemento alimenticio - Cosméticos - Medicina
Productos especiales	- Péptidos - Toxinas - Isotopos - Aminoácidos (prolina, arginina, acido aspártico - Esteroles	- Investigación - Medicina

1.1.4. Composición bioquímica microalgal

El valor de una especie microalgal está en función de su composición bioquímica; la cual depende de factores externos que afectan su crecimiento y metabolismo como la temperatura, iluminación (intensidad, longitud de onda y fotoperiodo), el pH del medio, suministro de CO₂, concentración y tipo de nutrientes, salinidad y fase de crecimiento (Abalde *et al.*, 1995; Ronsón, 2010).

Las microalgas presentan un alto contenido en proteínas de 15-65% del peso seco, lípidos ricos en ácidos grasos insaturados, aproximadamente del 5-30% y la fracción restante subdividida entre los carbohidratos, que en algunas especies pueden llegar hasta el 55% de la biomasa, también presentan vitaminas hidro- y liposolubles y otras moléculas como carotenoides, clorofilas, enzimas, aceites esenciales, hidrocarburos, glicerol, aminos y otros compuestos de importancia menor (Borowitzka, 1988; Abalde *et al.*, 1995; Sheehan *et al.*, 1998).

1.1.5. Lípidos en microalgas

La composición y concentración lipídica de las microalgas pueden variar desde menos de 1% hasta más del 40% del peso seco. Dependiendo principalmente de la especie y posteriormente la relación carbono:nitrógeno (C:N), las microalgas presentan variaciones en el perfil de lípidos celulares. En cultivos donde se ha suprimido la fuente de nitrógeno en condiciones controladas, la baja concentración de nitrógeno ha logrado obtener un incremento de hasta tres veces la concentración normal de lípidos y en ocasiones hasta un 80% de lípidos totales en peso seco, en conjunto con aumentos de peso y tamaño celular; otros factores que pueden influir son la iluminación, ciclo luz-oscuridad, temperatura, pH, fase de crecimiento y estado fisiológico (Guschina y Harwood, 2006; Hinzpeter *et al.*, 2006; Qiang *et al.*, 2008).

Los ácidos grasos constituyen la mayor fracción de lípidos llegando a constituir hasta el 80% del total de lípidos en microalgas, teniendo porcentajes comunes de entre 20 y 50%; formando ésteres de glicerol, se encuentran en los tri-glicéridos, diglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos. La mayoría de los ácidos grasos encontrados en los lípidos microalgales son moléculas de cadena recta con un número par de átomos de C (generalmente entre C₁₂ y C₂₂) resultado de su biosíntesis desde acetato por alfa-adición. Pueden ser saturados o insaturados (Kyle, 1991; Brown *et al.*, 1993; Chisti, 2007; Barraza *et al.*, 2009) y el producto lipídico de la extracción de biomasa de microalgas no posee el olor y sabor característicos del aceite de pescado (Hinzpeter *et al.*, 2006).

Cabe mencionar que los ácidos grasos altamente poliinsaturados (n-3) de cadena entre C₁₄-C₂₄ son las moléculas ideales para la producción de metil ésteres o biodiesel a partir de microalgas (Aullon, 2010); aun así se utilizan principalmente los triacilglicéridos para la obtención de biodiesel.

Los ácidos grasos más importantes son los poliinsaturados y de estos, los esenciales para el hombre son linoleico, araquidónico, linolénico y eicosapentanoico. A excepción del linoleico, los demás son raros tanto en alimentos de origen animal como vegetal, sin embargo están presentes en cantidades relativamente grandes en algunas microalgas (Abalde *et al.*, 1995).

1.1.6. Principales grupos de microalgas que producen aceite.

El Programa de Especies Acuáticas (ASP por sus siglas en inglés) del Departamento de Energía de E.U., representa el mayor esfuerzo a la fecha en la búsqueda de algas para obtención de biocombustibles; este programa se desarrolló durante 18 años de investigación (1978–1996), evaluando 3,000 cepas de algas que representan una amplia diversidad de ambientes acuáticos y tipos de aguas (Sheehan *et al.*, 1998). Las algas fueron valoradas por su tolerancia a condiciones extremas (salinidad, pH y temperatura) y su capacidad de producir lípidos. En 1996 se consolidó una colección de las 300 cepas más prometedoras, la mayoría de ellas algas verdes (Chlorophyceae) y diatomeas (Bacillariophyceae) (Qiang *et al.*, 2008).

Tabla II. Contenido lipídico de algunas microalgas que producen aceite (Chisti, 2007).

Microalga	Contenido de aceite (% en peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella</i> sp.	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20–35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23

1.2. Biocombustibles

1.2.1. Perspectiva histórica

La búsqueda de fuentes energéticas alternativas al petróleo nació desde la crisis petrolera de 1973. Actualmente volvemos a estar en crisis, cuyos principales motivos han sido el agotamiento de los combustibles fósiles y su creciente

demanda, principalmente del petróleo por ser una fuente de energía no renovable del cual depende en gran medida la economía de casi todos los países en desarrollo. Las crisis periódicas de este recurso y el denominado efecto invernadero provocado por la acumulación de anhídrido carbónico en la atmósfera, ha influido en los científicos hacia la búsqueda de nuevas fuentes de energía y la necesidad de evitar el empleo de vegetales aptos para alimentación y uso humano de tipo básico como los cereales y oleaginosas (maíz, girasol, soya, coco, palma, jatrofa, colza o canola, caña); cuyo uso para la producción de biodiesel ha disparado los precios de los mismos en el mercado internacional (Vieira-Costa, 2004).

El término biocombustible se refiere a combustibles sólidos, líquidos o gaseosos que son principalmente producidos a partir de materia prima renovable. La gran diferencia entre biocombustibles y combustibles a base de petróleo, es la cantidad de oxígeno contenida en sus moléculas, siendo mayor en biocombustibles. El contenido de oxígeno en el biodiesel mejora el proceso de combustión y disminuye su potencial de oxidación (Demirbas y Demirbas, 2010).

Actualmente los combustibles líquidos son ampliamente utilizados en el sector transporte, uno de los principales sectores de consumo energético a nivel mundial. Los biocombustibles renovables líquidos recientemente han atraído considerable atención debido a que su producción es renovable, son biodegradables y presentan amplia disponibilidad, además de los beneficios que brindan con respecto al desarrollo regional, creación de trabajos de manufactura rural y su producción contribuye a la reducción de gases de efecto invernadero (Demirbas y Demirbas, 2010).

1.2.2. Clasificación de los biocombustibles

Los biocombustibles pueden ser clasificados en base a su tecnología de producción como, biocombustibles de primera generación (BPG), de segunda generación (BSG), de tercera generación (BTG) y de cuarta (BCG) (ver Tabla IV). Los biocombustibles de primera generación refieren a combustibles obtenidos a partir de azúcar, almidón, aceites vegetales o grasas animales usando tecnología convencional. La materia prima básica para la producción de BPG es a menudo semillas o granos tales como avena, que produce almidón el cual es fermentado a etanol, o semillas oleaginosas como las de girasol, las cuales son exprimidas en prensas para obtener aceite vegetal que puede ser usado para biodiesel (Demirbas y Demirbas, 2010).

Una alternativa para reducir los impactos de la huella ecológica en la producción de bioenergéticos parecen ser los biocombustibles de tercera generación; que contribuyen en la reducción del uso de la tierra cultivable que pueda ser usada para consumo humano y que el potencial de rendimiento de energía por hectárea sea mucho mayor a los bioenergéticos de 1ª y 2ª generación en esta categoría se encuentran las microalgas siendo la principal fuente de biomasa para la producción de bioenergéticos de 3ª generación.

Tabla III. Clasificación de biocombustibles basado en su tecnología de producción (Li *et al.*, 2008; Demirbas y Demirbas; 2010).

Generación	Materia prima	Ejemplos
Primera	Azúcar, almidón, aceites vegetales, grasas animales	Bio-alcoholes, aceite vegetal, biodiesel, bio-syngas, bio-gas.
Segunda	No cultivos de consumo humano, paja de trigo, maíz, madera, residuos sólidos, cultivos energéticos	Bio-alcoholes, bio-aceite, bio-DMF, bio-hidrógeno, bio-fischer-tropsch diesel*, madera diesel.
Tercera	Algas	Aceite vegetal, biodiesel.
Cuarta	Aceites vegetales, biodiesel	Bio-gasolina.

*fischer-tropsch. Proceso químico para la producción de hidrocarburos líquidos (gasolina, keroseno, gasoil y lubricantes) a partir de gas de síntesis (CO y H₂). Inventado por los alemanes Franz Fischer y Hans Tropsch en 1920.

Por otro lado, hay una 4^a generación emergente que está basada en la conversión de aceites vegetales y biodiesel a bio-gasolina usando una tecnología más avanzada. Hoy en día existen algunas barreras para el desarrollo de la producción de biocombustibles, como lo son la falta de tecnología, economía, fuentes de materia prima y principalmente políticas donde se establezcan reglamentos de almacenamiento, seguridad, producción, materia prima, entre otros. Los costos de producción aun son inciertos y varía de acuerdo a la disponibilidad de la materia prima (Demirbas y Demirbas, 2010).

1.2.3. Biodiesel

El biodiesel es un biocombustible que se presenta en estado líquido y es una mezcla de alquil ésteres de cadena larga de ácidos grasos derivados de la transesterificación de aceites vegetales o grasas animales con alcoholes (e.g. metanol o etanol) que puede ser utilizada como combustible y se obtiene a partir de recursos renovables (Chisti, 2007); es un excelente sustituto del petrodiesel ya que su uso no requiere ninguna modificación en los motores, teniendo una productividad energética equivalente.

En 1911, Rudolph Diesel utilizó aceite de cacahuete (el cual contiene principalmente triacilglicéridos) para demostrar el funcionamiento de su motor diesel; pero la rápida introducción del petróleo a muy bajo precio motivó el remplazo y desincentivó la inversión en el desarrollo de la industria del biodiesel (Garibay, 2008)

El biodiesel tiene características similares al combustible fósil y puede emplearse en la sustitución total o parcial de este. La utilización del biodiesel puede ofrecer gran número de ventajas; como una menor contribución al calentamiento global de la atmósfera, ya que el CO₂ de la combustión del éster no contribuye a aumentar la concentración del mismo en la atmósfera, porque el carbono liberado como CO₂ por los motores corresponde en teoría al que es capturado de la atmósfera en la

fase de cultivos por el proceso de fotosíntesis, así que por cada 100ton de microalgas producidas, se consumen 183ton de CO₂ (Chisti, 2007). Además no posee azufre, que es una de las partículas más contaminantes del resto de los combustibles, siendo así más amigable con el ambiente, con emisiones más biodegradables (Barraza *et al.*, 2009).

1.2.4. Microalgas como bioenergético

Los primeros estudios de microalgas como potencial remplazo de la fuente de combustibles fósiles, se dieron en la década de los 70's debido a la crisis petrolera de estos años. Los costos excesivos de producción y otras limitaciones, desalentaron el desarrollo comercial de la producción de combustible a base de algas. En los últimos 20 años la evolución de la investigación con microalgas ha permitido desarrollar trabajos en campos como la acuicultura, química, alimentos, fisiología y metabolismo celular, farmacéutica, procesos industriales como el tratamiento de agua residual, entre otros, por lo que actualmente se considera como una opción viable el uso de cultivos de microalgas como fuente de biocombustibles, principalmente debido al aumento en el precio del petróleo y por la huella ecológica que tiene el producir y consumir combustibles de origen fósil (Li *et al.* 2008).

La producción de biodiesel a partir de microalgas, presenta ventajas adicionales, ya que en contraste con cultivos terrestres, las microalgas presentan una mayor eficiencia fotosintética y por su crecimiento en medio acuoso, son más eficaces en la asimilación nutrientes y CO₂, beneficio adicional de que su producción puede ser acoplada al reciclaje del carbono atmosférico que es liberado a causa de la combustión de combustibles fósiles. Así mismo, la producción de biodiesel microalgal no requiere de regiones fértiles, lo que favorece el uso de suelos no productivos como zonas áridas y semiáridas, en comparación con la dependencia geográfica y estacional a las regiones de cultivo de plantas oleaginosas (Abalde *et al.*, 1995; De *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2008; Greenwell *et al.*, 2009).

En lo referente a requerimientos de agua, los cultivos microalgales necesitan de cantidades menores respecto a los cultivos tradicionales, además de que las microalgas presentan una alta plasticidad metabólica ante el tipo y la calidad del agua. Igualmente, los cultivos de microalgas presentan la ventaja de que su contenido oleaginoso y su perfil de composición lipídico puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes (Abalde *et al.*, 1995; De *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2008; Rosenberg *et al.*, 2008; Greenwell, 2009).

Las microalgas contienen tres tipos de componentes principales: carbohidratos, proteínas y aceites vegetales y se ha demostrado que esta biomasa puede proporcionar diversos productos ricos en energía como el metano producido por la digestión anaeróbica de la biomasa; el biodiesel derivado de aceite microalgal e

hidrógeno producido fotobiológicamente (Benemann *et al.*, 1977, Cohen, 1986; Melis, 2002; Chisti, 2007).

Respecto al biodiesel, actualmente existen diferentes materias primas como fuentes de este, incluyendo al aceite de canola, grasa animal, aceite de palma, de maíz, aceite de cocina y aceite de jatrofa principalmente; en comparación, el contenido de aceite que producen las microalgas es de 10 a 20 veces mayor por cantidad de biomasa, que el derivado del aceite de palma (cultivo terrestre con mayor producción de aceite por biomasa) y de 200 a 400 veces mayor que el derivado del aceite de soya (Chisti, 2007; Demirbas y Demirbas, 2010).

Tabla IV. Comparación de algunas fuentes de biodiesel
(Chisti, 2007; Demirbas y Demirbas, 2010).

Cultivo	Rendimiento (L/ha)
Maíz	172
Soya	446
Canola	1,190
Jatrofa	1,892
Coco	2,689
Palma de aceite	5,950
Microalga ^a	136,900
Microalga ^b	58,700

^aproducción con un 70% de aceite vegetal en biomasa (peso seco).

^bproducción con un 30% de aceite vegetal en biomasa (peso seco).

1.2.5. Sistemas de producción microalgal

Las microalgas pueden ser producidas con gran variedad de métodos, desde los controlados por protocolos de laboratorio hasta métodos menos predecibles en tanques al aire libre. Los cultivos en interiores permiten controlar la iluminación, temperatura, nutrientes, contaminación por depredadores y microalgas competitivas, mientras que los sistemas de cultivo al exterior, aunque más baratos, hacen que sea más difícil el crecimiento de cultivos de microalgas específicas durante periodos prolongados. De los diferentes tipos de cultivos de microalgas utilizados en todo el mundo, el más adoptado es por lotes o también denominado tipo batch (Demirbas y Demirbas, 2010).

La producción de microalgas oleaginosas con el objeto de obtener biodiesel se puede realizar tanto en reactores cerrados, generalmente llamados fotobiorreactores (FBRs) o en reactores abiertos, conocidos como raceways o Lagunas Abiertas (RW, LA) que tienen el mismo diseño que las Lagunas de Oxidación de Alta Tasa (LOATs). Las LOATs y las LA son de forma elipsoidal con una separación central que permite formar canales poco profundos en forma de

circuito cerrado; y se mantienen en agitación mediante paletas giratorias, en ocasiones cuentan con mecanismos para suministrar CO₂ y nutrientes (Grobbelaar, 2009).

Los primeros FBRs fueron propuestos por Pirt *et al.*, (1983) y Torzillo *et al.*, (1986); permitiendo establecer cultivos de alta densidad celular de tres o más veces en comparación con los sistemas convencionales de carrusel.

La producción comercial de biodiesel requiere enormes cantidades de biomasa a través de cultivos en masa de microalgas. Las microalgas pueden ser cultivadas a gran escala en sistemas cerrados o en lagunas abiertas y cada sistema de producción presenta ventajas y limitaciones a lo largo del proceso de producción.

1.2.6. Ventajas y desventajas

1.2.6.1. Sistemas Abiertos – Raceway

La infraestructura de las lagunas abiertas o raceways es de bajo costo de construcción, operación y producción de biomasa; como lo es al utilizar la luz solar y el CO₂ disponible en la atmósfera. Sin embargo, presentan desventajas: la calidad y cantidad de luz solar natural es afectada de manera diaria y estacional; requieren de grandes áreas de terreno, sufren importantes pérdidas de CO₂ por difusión a la atmósfera y de agua por evaporación; esta tasa de evaporación está en función de la profundidad del cultivo en los raceways, que por lo general es de 0.2 a 0.3 metros, usados para proveer la suficiente cantidad de luz para la mayoría de las células; radiación, temperatura, velocidad del viento sobre la superficie del estanque y de la velocidad en que el cultivo está circulando en el raceway. Para raceways de 1000 m² Szadnoff (2006) registra pérdidas por evaporación de 5.7 a 6.2 mm o m³ por día (Chisti, 2007).

El sistema de mezcla del agua en raceway es deficiente; lo que origina una baja mezcla de nutrientes, la cual a su vez origina una baja productividad. Ésta última también resulta afectada por contaminación con otras algas y/o por organismos que se alimentan de microalgas, llevando a una costosa recuperación de la microalga blanco en medios diluidos y competitivos (Gong y Jiang, 2011). Y debido a las áreas que los raceways requieren y la profundidad de los mismos, es difícil el control de la temperatura y el pH (Grobbelaar *et al.*, 1996; Ma, 2009; Grobbelaar 2009, 2011; Gong y Jiang, 2011).

Estas desventajas de las lagunas abiertas estimularon el desarrollo de diversos tipos de fotobiorreactores, los cuales son sistemas cerrados que permiten un control más preciso de las condiciones de cultivo (Chisti, 2007; Loera-Quezada y Olguin, 2010), el cultivo de una sola especie por tiempos prolongados, la obtención de una alta productividad de biomasa y se puede evitar la contaminación (Molina-Grima *et al.*, 2004; Ugwu *et al.*, 2008).

Tabla V. Ventajas y desventajas de las lagunas abiertas y los fotobiorreactores para producción de biomasa algal (Ma, 2009; Grobbelaar, 2009, 2011).

Parámetro	Sistema abierto (Raceway)	Sistema cerrado (Fotobiorreactor)
Aprovechamiento de luz	Deficiente	Alto
Riesgo de contaminación	Alto	Bajo
Uso de Agua	Alto	Bajo
Pérdida de agua	Alto	Bajo
Pérdida de CO ₂	Alto	Casi ninguno
Variación de la temperatura	Baja	Media
Dependencia del clima	Alta	Menor si está protegido
Mezclado del medio de cultivo	Bajo	Alto
Daño celular	Bajo	Alto
Reproducibilidad de producción	Variable pero consistente en el tiempo	Posible dentro de ciertas tolerancias
Proceso de control	Complicado	Poco complicado
Estandarización	Difícil	Posible
Mantenimiento	Fácil	Difícil
Costos de construcción	Bajos	Altos
Productividad	Bajos	Altos
Problemas de sobrecalentamiento	Bajos	Altos
Altas concentraciones de oxígeno disuelto	Bajo	Alto

1.2.6.2. Sistema cerrado - Fotobiorreactor

A la fecha han recibido mucha atención debido a su alta productividad en biomasa y fácil control de las condiciones de cultivo; se han desarrollado y evaluado varios tipos de diseño de fotobiorreactores para diferentes propósitos (Flat-plate o planos, tubulares y de columna principalmente) (Borowitzka, 1999; Gong y Jiang, 2011).

La mayoría de los FBRs en condiciones ambientales exteriores se caracterizan por tener grandes áreas de iluminación, desde este punto de vista los modelos planos y tubulares horizontales e inclinados son los mejores, excepto por la dificultad de escalamiento, mientras que los de columna y el tipo tanque son de fácil escalamiento, pero tienen áreas de iluminación menores respecto al resto de los FBRs (Ugwu *et al.*, 2008). Por otro lado, es importante mencionar que existen numerosos reportes en la literatura sobre el uso de FBRs para la producción de

microalgas, siendo la mayoría experiencias a nivel laboratorio y muy pocas a nivel de planta piloto (Rodolfi *et al.*, 2009). Las revisiones sobre este tema son diversas, Chisti (2007) recomienda el uso de FBRs, sin embargo otros expertos que han tenido años de experiencias de cultivo de microalgas a escala comercial defienden ampliamente el uso de las lagunas abiertas o raceways (Sheehan *et al.*, 1998; Ben-Amotz, 2009). El debate se centra fundamentalmente en dos aspectos: los FBRs son mucho más productivos que las LA y permiten controlar mejor las posibles contaminaciones y sin embargo, son mucho más costosos, lo que incrementa el costo de la producción de biomasa.

1.2.7. Recuperación de biomasa - Cosecha

Para la recuperación de la biomasa algal del cultivo se han planteado diferentes métodos: centrifugación, floculación, sedimentación, filtración, microfiltración y ultrafiltración (Molina-Grima *et al.*, 2004; Chisti, 2007). También se han cosechado microalgas utilizando ondas ultrasónicas y floculación electrolítica utilizando electrodos en el medio de cultivo; métodos que no son muy costosos a nivel industrial (Uduman *et al.*, 2010).

La tecnología elegida depende de la especie con la cual se está trabajando y si se tiene una bio-refinería microalgal en teoría podría simultáneamente producir biodiesel, forraje, fertilizantes, biogás y energía eléctrica (Wijffels y Barbosa, 2010; Wijffels *et al.*, 2010). Así como la extracción de otros productos de alto valor relacionados con la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia (Sánchez-Mirón *et al.*, 2003).

1.3. Antecedentes

Son numerosos los trabajos que actualmente se realizan para la obtención de biocombustibles a partir de microalgas; los más relevantes se presentan en la siguiente Tabla (Ver Tabla VI).

Tabla VI. Principales trabajos de obtención de lípidos para biodiesel a partir de microalgas.

MICROALGAS UTILIZADAS	ARTÍCULO	CONDICIONES Y SISTEMA DE CULTIVO	LÍPIDOS PARA BIODIESEL OBTENIDO	OBSERVACIONES
<i>Nannochloropsis oculata</i> ^M	Chin <i>et al.</i> , 2011.	Medio de Cultivo. Johnsons modificado para microalgas marinas	B 20.65g / 31.4%	Condiciones controladas de T°, Luz, pH, Aireación y medios de cultivo Volumen de cultivos A.30L, B.20L, C.7L, Cosecha por filtración Secado en Incubadora, Pulverizado en mortero Extracción aceite: Hexano 200mL / Soxhlet 80°C * 2hr / Rotovapor
<i>Dunaliella tertiolecta</i> ^M			B 20.75g / 34%	
<i>Chlorella vulgaris</i> ^D		Medio Bold Basal para microalgas dulceacuícolas	A 21.20g / 19.5%	
<i>Selenastrum capricornutum</i> ^D		Cultivos en Garrafrones / fotobiorreactor	B 17.85g / 11.2%	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ^D			C 5.32g / 9.4%	
<i>Chlorella vulgaris</i> ^D	Lardon <i>et al.</i> , 2009	Concentraciones normales y limitantes de Nitrógeno	Condiciones Normales 17.5%	Raceway. 10m de ancho, 100m largo, 30cm profundidad 20 and 30 g·m-2 ·dia-1 Forma. Ovalada
		Cultivo en estanques tipo Raceways	Condiciones estrés <[N] 38.5%	
<i>Chlorella vulgaris</i> ^D	Widjaja, 2009.	Efecto de la concentración de N y CO ₂ ; Medio de cultivo propio parecido al F/2 cultivo en Garrafrones	15d 1.1x10 ⁷ cel/mL, biomasa 0.55mg/mL 26.71% lípidos totales, 9.75mg/L/día productividad lípidos 20d 1.3x10 ⁷ cel/mL, biomasa 0.86mg/mL, 29.53% lípidos totales, 12.77mg/L/día	Extracción. Secado, liofilizado, pulverizado, cloroformo-metanol (2:1), mezclado y centrifugado, filtrado y roto-evaporador

^M. Especie marina;

^D. Especie dulceacuícola

<i>Chlorella vulgaris</i> ^D	Gouveia y Oliveira, 2009	Biorreactores / Bolsas de Polietileno 150uE/m/s en laboratorio	1.5 g/L, 0.18 g/L/día, 5.1%	<i>Nannochloropsis</i> sp. y <i>N. oleabundans</i> a menor cantidad de N aumenta 50% la cantidad de aceite; Máxima concentración de biomasa <i>N. oleabundans</i> y <i>S. obliquus</i> , 2g/L; <i>Dunaliella</i> sp. 3g/L. Evaluación de Crecimiento. DO 540nm - Peso seco Whatman GF/C 45um. Extracción. Sonicado por 20 min y pre-tratado con propanol, método Soxhlet con n-hexano; <i>S. obliquus</i> El mejor perfil de ácidos grasos (Linoleico/A.G. poliinsaturados)
<i>Spirulina maxima</i> ^M			2.0 g/L, 0.21 g/L/día, 4.1%	
<i>Nannochloropsis</i> sp. ^M			1.6 g/L, 0.09 g/L/día, 28.7%	
<i>Neochloris oleabundans</i> ^D			1.5 g/L, 0.09 g/L/día, 29.0%	
<i>Scenedesmus obliquus</i> ^D			0.9 g/L, 0.09 g/L/día, 17.7%	
<i>Dunaliella tertiolecta</i> ^M		Medio de cultivo deficiente de Nitrógeno	2.6 g/L, 0.12 g/L/día, 16.7%	
<i>Scenedesmus obliquus</i> ^D	Da Silva <i>et al.</i> , 2008.	Sistemas semicontinuos en medio Bristol Fotobiorreactores planos de 50L a 25°C, 150uE/m/s 14:0 (luz:oscuridad) por 103 días Raceways de gran escala 2.5m ² 15cm de profundidad 25cm/s, por 59 días	Contenido máx. lípidos <i>N. oleabundans</i> 16.5% (w/w) a los 74 días, con 54.6% w/w en AG insaturados del total de lípidos	Evaluación del crecimiento cada dos días y se evaluó la densidad óptica a 540nm por duplicado. Lípidos evaluados con Rojo de Nilo (50uL/5mM) y acetona (0.1 mg/mL) a 1mL de suspensión celular (105 - 106 cel/mL) incubando 10min a 37°C en oscuridad leídos por clitómetro de flujo FANscan a 488nm con laser de argón.
<i>Neochloris oleabundans</i> ^D			<i>S. obliquus</i> presentó 12.8% (w/w) a 71 días con 64.7% w/w en AG insaturados	
<i>Chlorella protothecoides</i> ^D	Demirbas, 2009.	Muestreadas del Lago Suero en Trabzon (Turquía) 100m altitud	29.4±1.5 % lípidos totales; Ac.G. Saturados 10.8±0.6%, Monosaturados 24.1±1.2%, Poliinsaturados 62.8±2.5%, Libres 2.6±0.2%	Extracción. Con Hexano en Soxhlet durante 18h. Transesterificación. Con metanol súper-crítico con métodos Kusdiana y Saka 2001, Dermirbas, 2002. Datos de % de compuestos lipídicos en base al peso seco.

^M. Especie marina;

^D. Especie dulceacuícola

<i>Scenedesmus obliquus</i> ^D			AG. 50ug/mg peso seco	
<i>Cryptomonas erosa</i>			AG. 35-45ug/mg peso seco	Extracción de ácidos grasos y pigmentos.ala biomasa liofilizada se le agrega 1mL acetona pellets (0.5mg, 3mL), 4mL de 2:1 diclorometano/metanol y 0.2g de cuarzo de 10-30um y subsecuente extracción en baño ultrasónico (35kHz;80W) por 90min a -4°C usando agua de mar, centrifugado y recuperado el solvente; método con doble extracción mismos pasos y 5 réplicas. Dimetilformamida (DMF) solvente más eficiente (tóxico)
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	Wiltshire <i>et al.</i> , 2000.	Quimiotato con medio WC a 20°C y 300umol/m/s de luz	AG. 45-47ug/mg peso seco	
<i>Microcystis aeruginosa</i>			AG. 45-47ug/mg peso seco	
<i>Staurastrum paradoxum</i>			AG. 38-50ug/mg peso seco	
<i>Monodus subterraneus</i>			PR de EPA 34.2%, 96.3mg/L	MC. Proteosa; tiempo 10 días, biomasa 2566mg/L
<i>Chlorella minutissima</i>		Cepas provenientes de las colecciones. UTEX, ATCC y CSIRO todos los cultivos inoculados con 5% del volumen total con inóculos en fase exponencial, crecidas en matraces de 250mL c/150mL de medio, en batch a 25°C c/agitación intermitente a 60uE/m²s	PR de EPA 31.3%, 36.7mg/L	MC. Agua de mar artificial; tiempo 10 días, biomasa 995mg/L
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Vazhappilly y Chen, 1998		PR de EPA 21.4%, 43.4mg/L	MC. LDM; tiempo 10 días, biomasa 1934mg/L
<i>Crypthecodinium cohnii</i>			PR de DHA 19.9%, 19.5mg/L	MC. exclusivo para <i>Porphyridium</i> ; tiempo 10 días, biomasa 1510mg/L
<i>Amphidinium carterae</i>			PR de DHA 17.0%, 8.6mg/L	MC. Erd-Schreiber; tiempo. 23 días, biomasa 499mg/L
<i>Thraustochytrium aureum</i>			PR de DHA 16.1%	MC. By; tiempo 20 días; biomasa 101mg/L
AG.	Ácidos Grasos			
PR.	Porción y Rendimiento en % del total de A.G.			
MC.	Medio de cultivo			

<i>Scenedesmus obliquus</i> ^D	Mandal y Mallick, 2009	Cultivos heterótrofos Pre-crecimiento en glucosa 1.5% enriquecido con medio N11. En 150mL matraz erlenmeyer con 50mL de medio N11 a pH6.8 25±2°C 14:10 luz:obscuridad	La adición de 0.6 g/L de Tiosulfato de Sodio, el contenido de lípidos se elevó a 30.4%.	Curva de crecimiento 21 días Extracción. Bligh y Dyer (1959) 2mL Me OH 1mL CHCl ₃ ; guardar a 25°C por 24 h; vortex 2 min y adicionar 1mL de CHCl ₃ ; centrifugar, filtrar whatman #1, baño maría 30min para evaporación de los solventes.
---	---	Producción máxima por día de biomasa, lípidos y productividad obtenidos*,		
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>		Medio de cultivo 3N BBM	0.25g/L-día, 400mg/L-día, 55mg/L-día	Cultivos. Batch, iniciando en matraces con 500mL de cultivo por 7-10 días; En fotobiorreactor de vidrio 60cm de alto, diámetro de 10 cm grosor tubo 5cm, volumen de cultivo 3.2L. Aire enriquecido con 0.29% de CO ₂ rociado a 2L/min, con luz 250 µmol-photons/m/s. temperatura 25±1°C, Medición de biomasa. Diario por Densidad óptica 750nm *en condiciones limitadas de nitrógeno.
<i>Chlorella vulgaris</i>		Medio de cultivo 3N BBM	0.27g/L-día, 600mg/L-día, 67mg/L-día	
<i>Neochloris oleoabundans</i>		Medio de cultivo 3N BBM	0.29g/L-día, 420mg/L-día, 50mg/L-día	
<i>Scenedesmus</i> sp.		Medio de cultivo 3N BBM	0.30g/L-día, 650mg/L-día, 105mg/L-día	
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Griffiths <i>etal.</i> , 2011.	Medio de cultivo de Walne	0.35g/L-día, 360mg/L-día, 52mg/L-día	
<i>Isochrysis</i> sp.		Medio de cultivo de Walne	1.23g/L-día, 230mg/L-día, 41mg/L-día	
<i>Nannochloropsis</i> sp.		Medio de cultivo de F/2	0.24g/L-día, 460mg/L-día, 61mg/L-día	
<i>Pavlova</i> sp.		Medio de cultivo de Walne	0.17g/L-día, 110mg/L-día, 10mg/L-día	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		Medio de cultivo de Walne	0.34g/L-día, 400mg/L-día, 45mg/L-día	
<i>Tetraselmis suecica</i>		Medio de cultivo de F/2	0.49g/L-día, 250mg/L-día, 47mg/L-día	
<i>Spirulina platensis</i>		Medio de cultivo de Zarrouk	0.28g/L-día, 20mg/L-día, 5mg/L- día	

2. JUSTIFICACIÓN

Recientemente, ante la creciente demanda energética se piensa en los cultivos de microalgas como una de las mejores alternativas para la producción de biomasa como fuente de biocombustibles modernos, ya que los sistemas de cultivo ocupan poco espacio, su biomasa aumenta en cuestión de horas y se adecuan al secuestro de CO₂, uno de los principales contaminantes ambientales en la actualidad. Sin embargo no todas las microalgas son susceptibles de explotación para este fin, ya que en algunos casos, aunque producen una gran cantidad de biomasa, no es rica en lípidos y debe destinarse a otros fines. Para esto es necesario realizar pruebas a escala piloto, para determinar cuáles microalgas son susceptibles de explotación, bajo qué sistemas de alimentación y en qué condiciones para la producción de biocombustibles

En este trabajo se buscó abordar y exponer el rendimiento de producción de biomasa algal en dos sistemas de cultivo diferentes (fotobiorreactores tipo columna de 16 y 75 litros y estanques tipo raceways de 300 y 3000 litros), evaluando para ello las tasas de crecimiento celular, biomasa y producción de lípidos totales susceptible a la transesterificación para la obtención de biodiesel, utilizando las microalgas dulceacuícolas *Desmodesmus quadricauda* y *Chlorellavulgaris*.

3 OBJETIVO

Determinar el sistema más efectivo de producción de biomasa en dos microalgas Chlorophytas, *Desmodesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris* para la producción de lípidos susceptibles a transformarse en biodiesel.

3.1. Objetivos específicos

- Mantener y escalar los cultivos microalgales de *Desmodesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris* en 3 niveles de producción; fotobiorreactores 75 L, raceways de 300 y de 3,000 Litros.
- Analizar el comportamiento de los sistemas de cultivo de microalgas, comparando fotobiorreactores y raceways mediante cinéticas de crecimiento y producción de lípidos totales.

4 METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en dos etapas; 1) cultivo de microalgas en fotobiorreactores y lagunas abiertas y 2) análisis de muestras de biomasa microalgal obtenida de los cultivos.

La primera etapa se llevó a cabo en la Planta piloto de Investigación en Microalgas (PPIMA) de la Universidad Iberoamericana de Puebla, en instalaciones de invernadero, allí se realizaron los cultivos en fotobiorreactores en columna y en estanques tipo raceway.

La segunda etapa que corresponde a los análisis de las muestras, se realizaron en el laboratorio de Ficología Aplicada de la UAM-Iztapalapa, donde se obtuvieron las cepas que utilizamos en la presente investigación y se cuenta con la infraestructura necesaria para los análisis.

4.1. Cultivo batch de las microalgas *Desmodesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris*

4.1.1. Microalgas

Se establecieron los cultivos masivos, utilizando las cepas nativas de especies de microalgas dulceacuícolas *Desmodesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris*; las cuales se obtuvieron de la colección de cepas del laboratorio de Ficología Aplicada de la UAM-I.

4.1.2. Medios y condiciones de cultivo

Los cultivos se iniciaron en el Laboratorio de biomasa y microalgas de la Universidad Iberoamericana de Puebla, en condiciones controladas de laboratorio en matraces erlenmeyer de 250mL con un volumen de cultivo de 150mL y 150μL de fertilizante foliar Bayfoland en una relación de 1mL por cada litro de agua. Posteriormente se escalaron a volúmenes de 3L y consecutivamente a sistemas de 15L; hasta este punto los cultivos se mantuvieron con un fotoperiodo 12:12 luz:oscuridad, a temperatura promedio 22-23°C con una intensidad lumínica equivalente al 10% de la existente en la superficie del agua a pleno sol (160 μE m⁻²s⁻²) proporcionada por tubos fluorescentes de neón de 40W.

Posteriormente los cultivos se trasladaron al invernadero de la planta piloto de microalgas de la Universidad Iberoamericana Puebla, donde se mantuvieron en condiciones naturales no controladas y se escalaron a fotobiorreactores (FBR) de 75L y a estanques tipo raceway de 300 y 3,000L (fig. 1); las temperaturas llegaron a variar de 14° hasta 37.9°C en los cultivos. Las horas luz en los días de cultivo fue de aproximadamente 13 horas.

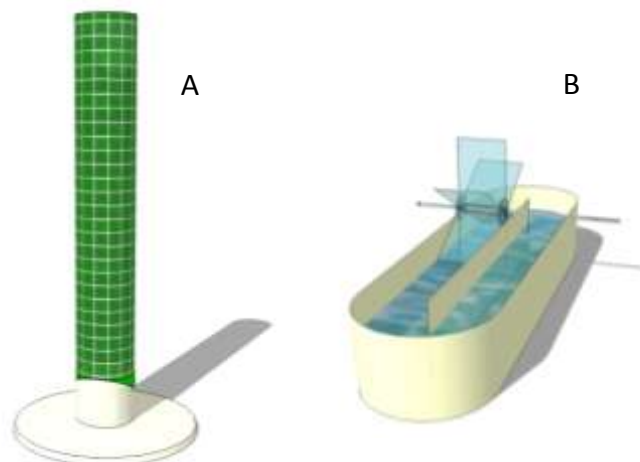


Figura 1. Biorreactores. A) Fotobiorreactor en columna, B) Raceways o laguna abierta. Diseño realizado en Google SketchUp.

4.1.3. Monitoreo de crecimiento.

4.1.3.1. Conteo celular.

Para la obtención de las curvas de crecimiento se tomaron muestras homogéneas diarias de 1mL y por triplicado; se fijaron con acetato de lugol al 10% y se midió la concentración celular (cels/mL) con una cámara de Neubauer al microscopio. El conteo celular se realizó en un microscopio Boeco modelo BM-180 SP; con los objetivos 10 y 40X.

El registro del conteo se realizó contando las células que quedan dentro de cada una de las cuadrículas marcadas como A, B, C, y D y se realizó un promedio de los cuadrantes (Figura 2) (Abalde, 1995; Arredondo-Vega y Votolina, 2007).

Se calculó la concentración celular por mililitro (cel/mL) utilizando la siguiente fórmula (Arredondo-Vega y Votolina, 2007).

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

En donde:

C = cel/mL

N = promedio de las células presentes en 1mm^2 (0.1 μL)

Dil= factor de dilución

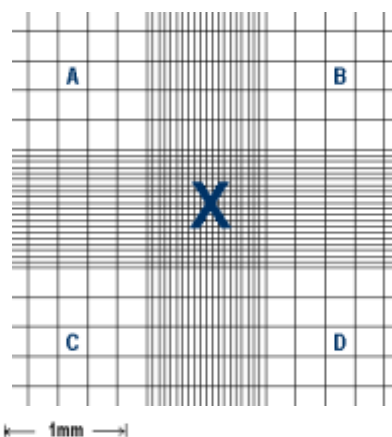


Figura 2. Diagrama de cámara Neubauer de 9mm^2 .

Los datos de concentración celular de cada recuento se graficaron para obtener una curva del crecimiento celular en días, graficando en el eje de las abscisas (x) el tiempo en días y en las ordenadas (y) los valores de la concentración celular.

4.1.3.2. Medición de Parámetros

Utilizando una sonda multi-paramétrica HANNA (modelo HI 9828) se registraron tres parámetros físico-químicos; temperatura, pH y oxígeno disuelto (OD ppm).

Los resultados de las mediciones se graficaron con respecto al tiempo (en días de cultivo) y a las unidades del parámetro de medición (°C, pH y ppm).

4.1.4. Escalamiento

Una vez obtenida una concentración de aproximadamente 20,000 células/mL en fase exponencial, se escaló por triplicado a bidones de cultivo en 3.5L, de ahí se resembró en bidones de 15 L para generar el inóculo de los fotobiorreactores y raceways (fig. 3)

Se escalaron en tres niveles de producción (fotobiorreactores de 75 Litros, raceways de 300 y 3,000 Litros)

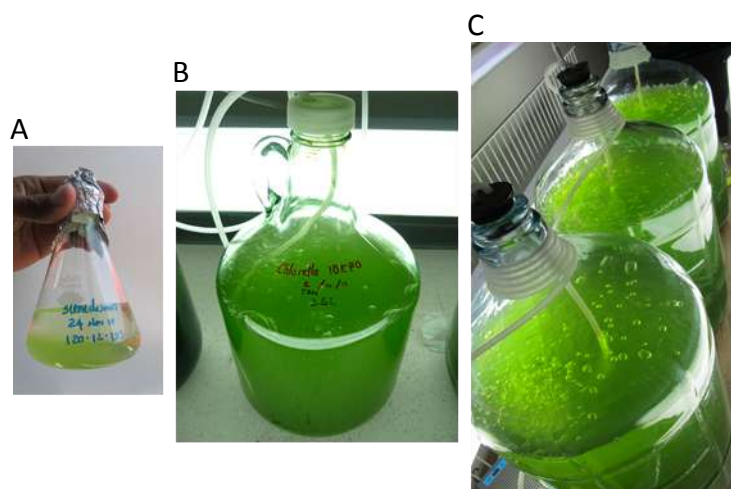


Figura 3. Generación de inóculo. El primer inóculo se genera en matraces, después de ahí se lleva a bidones de vidrio y de ahí a Garrafones. A. Matraz (150mL), B. Bidón (3L), C. Garrafón (15L).

4.1.4.1. Preparación de sistemas de cultivo.

Para llevar a cabo los cultivos, todo el material de cristalería a utilizar se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 lbs de presión por 15 min.

En el caso de los garrafones de se lavaron con ácido muriático, para quitar todas las impurezas y remanentes del vidrio, se enjuagaron, secaron y se volvieron a lavar con cloro.

Las piedras de aireación, mangueras, tubos de PVC, soportes (Tabla VI), se lavaron y trataron químicamente dejándolas sumergidas por 12h en cloro comercial marca Cloralex diluido al 10% (hipoclorito de sodio al 5% v/v en agua), y se utilizó tiosulfato de sodio el cual reacciona con el Hipoclorito liberando el Cloro en forma gaseosa y formando sales.

Una vez instalados los sistemas de cultivo (Tabla VII), se procedió a llenarlos con agua de pozo y se procedió a esterilizar químicamente con cloro comercial (cloralex) adicionándole 3mL por cada litro de agua, se agitó (aireación) y dejó actuar el cloro por 24 h. Posteriormente se adicionó tiosulfato de sodio, utilizando 2.85gr por cada 18 Litros y se dejó con aireación al menos por 1 hora, para favorecer la eliminación del cloro (Tabla V).

Tabla VII. Concentraciones de Hipoclorito de Sodio y Tiosulfato de Sodio necesarios para los diferentes volúmenes de cultivo.

Volumen (L)	Hipoclorito de Sodio (mL)	Tiosulfato de Sodio (gr)
Regla	3mL/L	2.85gr/18L
13.5	40.5	2.1
63	189	10.0
270	810	42.8
2,700	8,100	427.5

Tabla VIII. Sistemas de cultivo, capacidades y volúmenes

Sistema	Capacidad Litros	Volumen de cultivo (L)	Fertilizante Foliar (mL)
Matraz	0.250	0.150	150uL
Bidón	4	3	3
Garrafón	19	12	12
Fotobiorreactor	80	75	70
Raceway chico	300	200	200
Raceway grande	3,000	2000	2000

4.2. Siembra

Antes de resembrar los sistemas y ya tratada químicamente el agua, se le agregó el fertilizante foliar con una relación de 1mL/L (Tabla VII)

Se inoculó cada sistema de fotobiorreactores y raceways con un inóculo que corresponde al 10% del volumen final y los cultivos que se utilizaron como inóculo estaban siempre en fase de crecimiento exponencial.

Una vez resembrados se llevó un control de crecimiento por conteo celular, registrando también los principales parámetros físico-químicos.

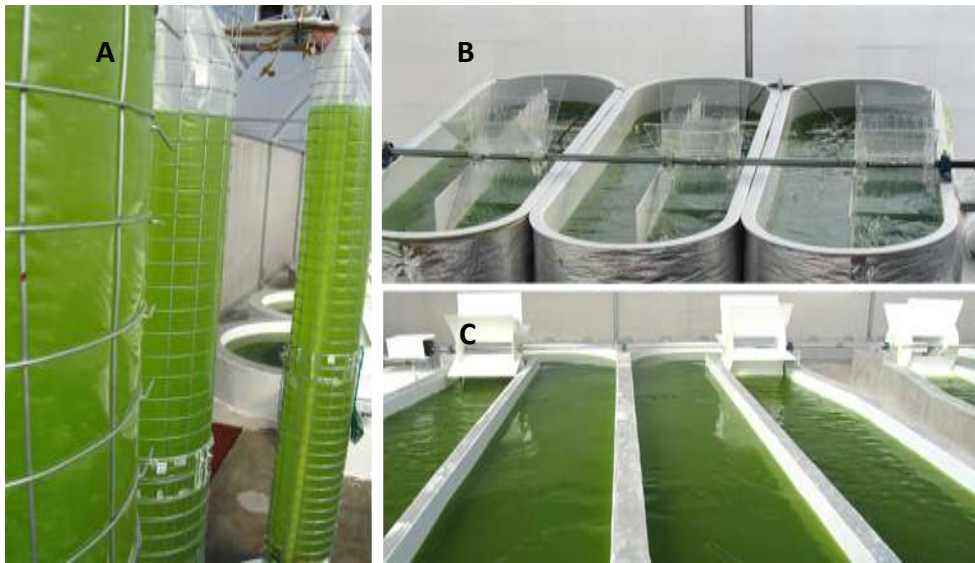


Figura 4. Sistemas de cultivo. A. Fotobiorreactores de 75L; B. Raceways chicos de 300L y C. Raceways grandes de 3,000L.

4.3. Cosecha

La toma de muestra y cosecha de la biomasa se realizó en dos tiempos, a la mitad de la fase de crecimiento exponencial del cultivo y al inicio de la fase estacionaria del crecimiento.

La obtención de la biomasa se llevó a cabo mediante centrifugación con una centrifuga de flujo continuo. Se separaron y centrifugaron 10L de cultivo. Las muestras cosechadas se guardaron en tubos tipo falcon de 50mL, a -20°C para posteriormente ser liofilizadas y analizadas en su composición proximal.

4.4. Análisis de composición bioquímica.

De la biomasa congelada y liofilizada se pesó 5mg de muestra para cada determinación proximal de proteínas, carbohidratos y lípidos.

Las proteínas se determinaron según el método de Lowry *et al.* (1951); previo a la determinación, se obtuvo una curva de calibración con albúmina sérica bovina (ASB) para referencia de la cantidad proteica y se realizó la extracción cuantitativa de las muestras, considerando la composición de la pared celular; por lo que se desarrolló en termo-baño a 100°C por 60 min agregando 5mL de NaOH 1N, posteriormente se centrifugó a 2,900 rpm (15 min a 10°C), recuperando el extracto alcalino; de este extracto se tomaron 3 muestras de diferente volumen (250, 500 y 750 μl) que posteriormente se leyeron en el espectrofotómetro.

La extracción de los lípidos se realizó según el procedimiento propuesto por Bligh y Dyer (1959) adaptado para la extracción de microalgas, utilizando una mezcla $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (Cloroformo:metanol) para la extracción de lípidos totales (polares y no polares) y su determinación espectrofotométrica fue mediante el método de calcinación de Marsh y Weinstein (1966) donde se utilizó H_2SO_4 como reactivo simple y estable (Arredondo-Vega y Voltolina 2007).

La cuantificación de carbohidratos totales se realizó por el método fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al*, 1956), en donde también se utilizó el H₂SO₄ diluido que hidroliza los enlaces glucosídicos; obteniendo por ultrasonido o termo-baño un extracto que disocia las membranas celulares permitiendo a este método ser sensitivo a una amplia variedad de carbohidratos, incluyendo azúcares, azúcares metilados y polisacáridos (ácidos y neutrales) (Arredondo-Vega y Voltolina 2007).

4.5. Obtención de extracto lipídico para biodiesel

Se realizaron diferentes métodos de extracción de compuestos lipídicos para seleccionar el de mayor rendimiento la biomasa microalgal.

Para ello, se utilizó una muestra de cultivo de *Desmodesmus quadricauda*, obtenida en fase estacionaria de crecimiento celular y se procedió a concentrar la biomasa algal, lo cual se realizó por filtrado al vacío con tela de lino de 56 hilos/cm y con papel filtro Whatman 4 (20-25µm). Se registró un peso de 456.3g de biomasa hidratada. Posteriormente se determinó la humedad de 52g de muestra húmeda en una capsula de aluminio con 10gr de biomasa, se colocó a estufa a 95°C hasta peso constante, obteniendo 77.5% (Fig. 5).



Figura 5. Obtención de biomasa para biodiesel. A. Sistema de filtrado; B. Sedimentado; C, D. Filtrado al vacío utilizando filtro de fibra de vidrio; E. Pesado de la biomasa 456.3 g.

4.5.1. Método Goldfish (AOAC, 1990)

Se colocaron 3.160g de biomasa anhidra en un vaso goldfish (recipiente poroso) a peso constante (68.128g). El mismo recipiente se colocó en un soporte que lo ubicó debajo de un condensador; en el vaso (más grande) se colocaron 50mL de hexano; los dos vasos se colocaron en el equipo goldfish y se dejó 4 h en reflujo; el hexano se evaporó y condensó sobre el recipiente que contiene la muestra y al caer por gravedad la atraviesa y arrastra los lípidos, repitiéndose este ciclo; al final se destiló la mezcla hexano-aceite, quedándonos con el aceite (fig.6)

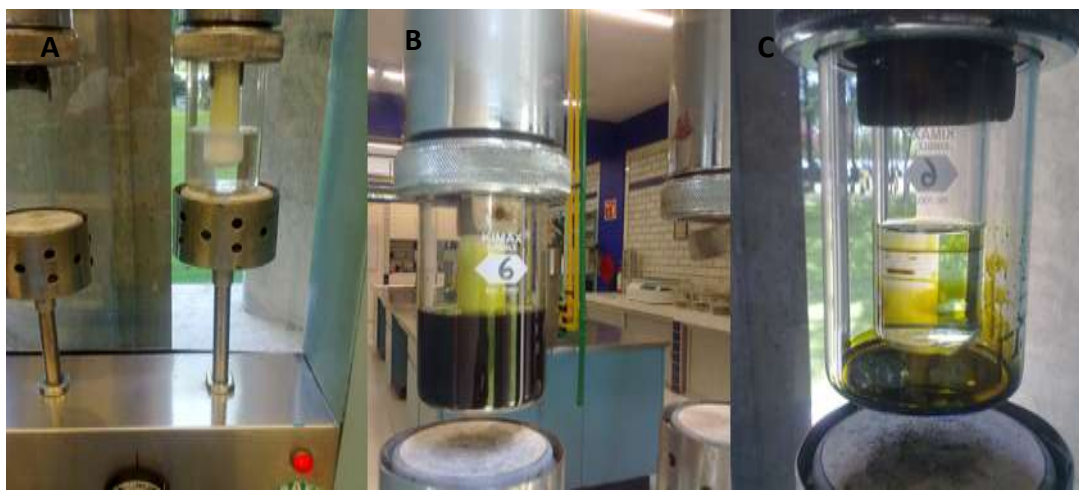


Figura 6. Extracción de lípidos por método goldfish. A. Sistema goldfish; B. Extracción por re-circulación con hexano; C. recuperación de hexano.

4.5.2. Método Röse-Gottlieb (AOAC, 1990)

En este método se destruye la membrana proteica por NH_3 y extrae la grasa con solventes orgánicos

Se pesaron 2.1g de biomasa anhidra y se agregaron 2 ml de amoníaco, 10 ml de alcohol etílico, 25 ml de éter y 25 ml de éter de petróleo; se mezclaron, agitando cada vez que se agrega uno de estos líquidos. Se dejó reposar 2 horas hasta separarse completamente una capa opaca inferior y otra transparente superior que lleva disuelta el aceite; posteriormente se destila la mezcla para retirar los solventes (Figura 7).



Figura 7. Extracción por método Röse-Gottlieb. A. Extracción por éter; B, Evaporación de solventes.

4.5.3. Método Reflujo, basado en el método Soxhlet (AOAC, 1990)

Se pesaron 7.011g de biomasa anhidra, se colocaron en un matraz de bola con 50mL de hexano y un agitador magnético, en una parrilla magnética a 90°C aprox. y agitación constante, se montó el refrigerante tipo rosario y se puso a reflujo con agua (fig.8)



Figura 8. Extracción de lípidos por método de Reflujo.

5 RESULTADOS

Se llevó a cabo la determinación de la curva de crecimiento microalgal, mediante conteo celular, en garrafones con un volumen de cultivo de 15L, el conteo se realizó por triplicado. En ambas especies, *Desmodesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris*, la fase estacionaria inició al día 6, por lo que a partir de ese día se procedió a cosechar y escalar al siguiente sistema de cultivo. (Figura 9).

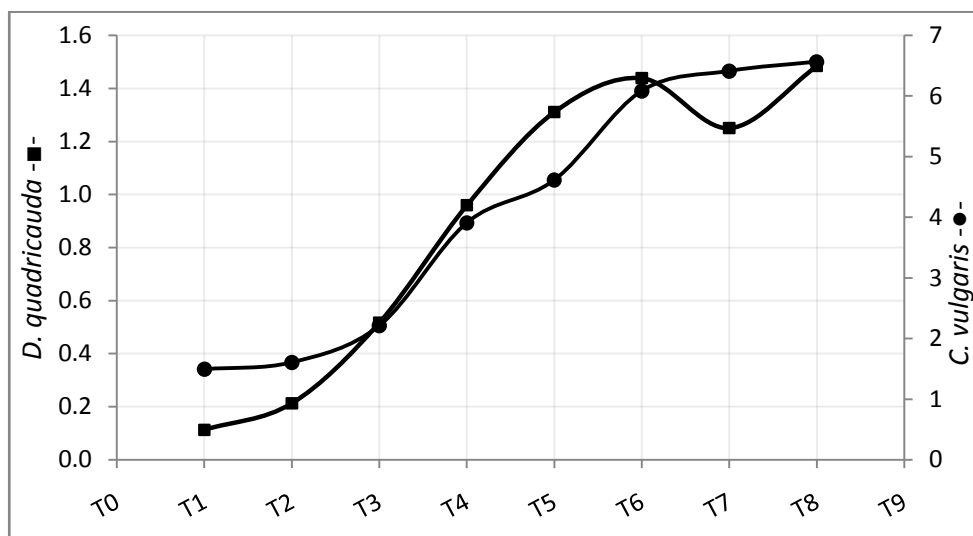


Figura 9. Curva de crecimiento celular de *Desmodesmus quadricauda* -■- y *Chlorella vulgaris* -●- en millones de células por mililitro ($\times 10^6$).

5.1. *Desmodesmus quadricauda*

5.1.1. Parámetros de cultivo

Para los sistemas de cultivo a mayor escala, con la especie *D. quadricauda* los pH fluctuaron entre 8.5 y 9.5, y la tendencia del OD ppm fue negativa a partir de T5 y T6 para los raceways de 300 y 3000L. Los fotobiorreactores en columna presentaron una variación más pronunciada de temperatura entre 20.7°C por las mañanas y llegando hasta 37.9°C.

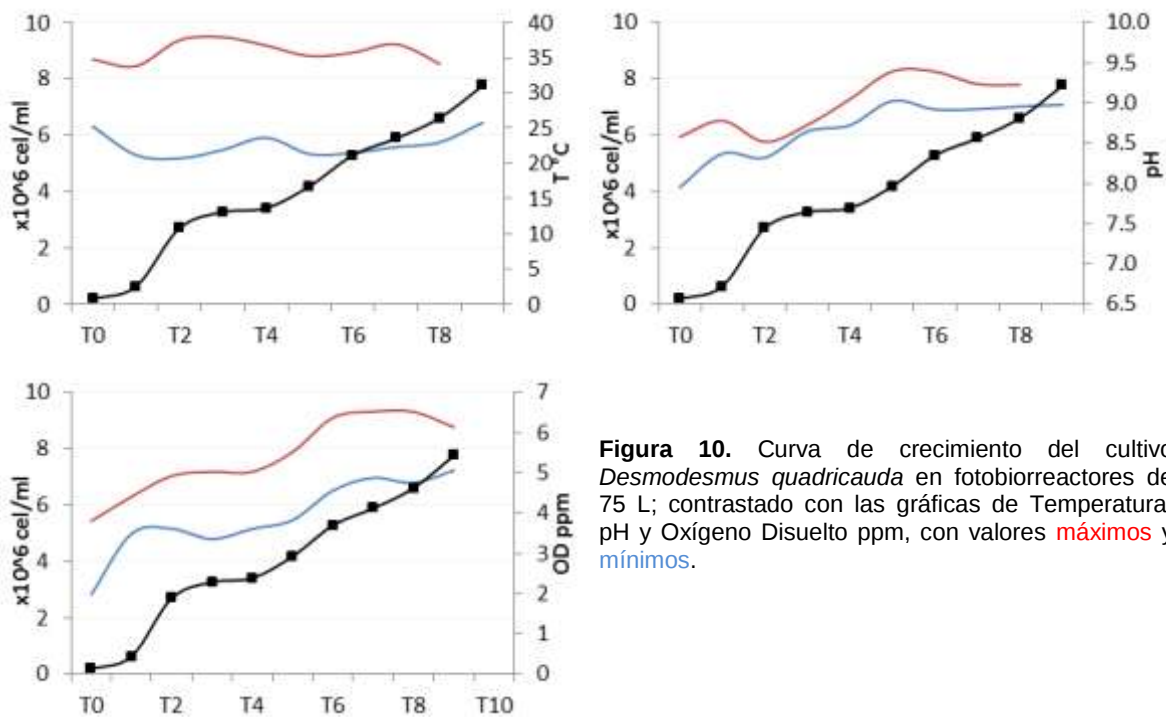


Figura 10. Curva de crecimiento del cultivo *Desmodesmus quadricauda* en fotobiorreactores de 75 L; contrastado con las gráficas de Temperatura, pH y Oxígeno Disuelto ppm, con valores **máximos** y **mínimos**.

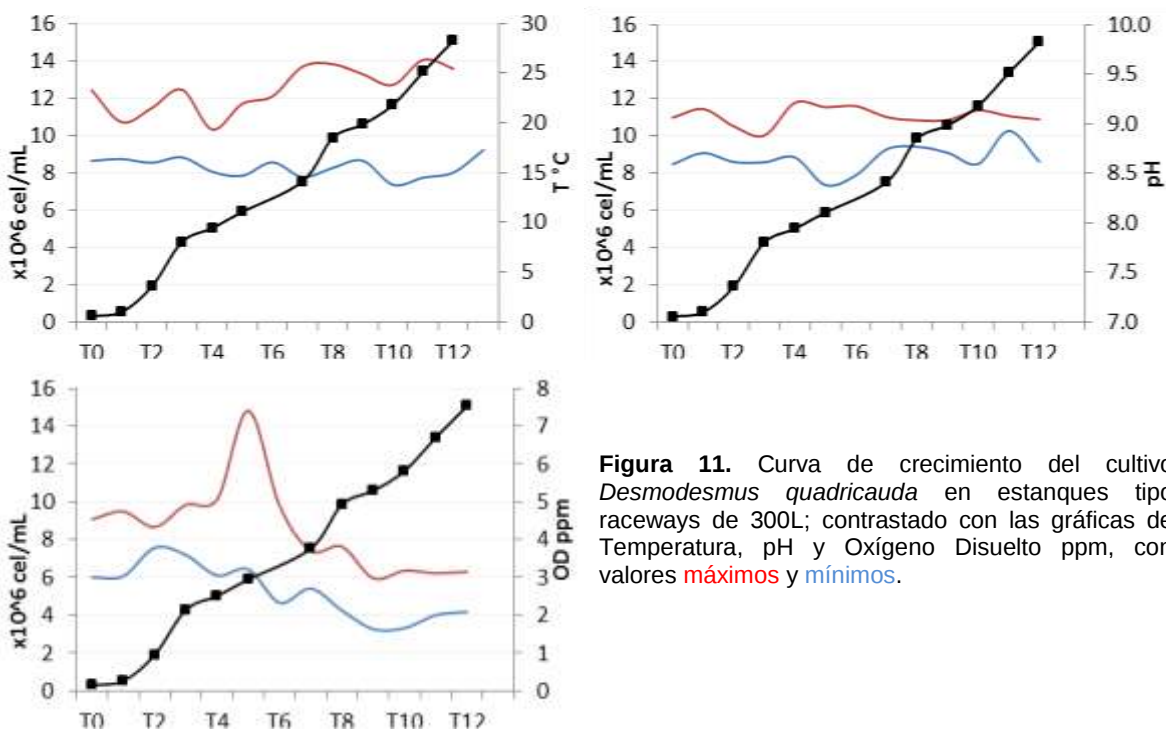


Figura 11. Curva de crecimiento del cultivo *Desmodesmus quadricauda* en estanques tipo raceways de 300L; contrastado con las gráficas de Temperatura, pH y Oxígeno Disuelto ppm, con valores **máximos** y **mínimos**.

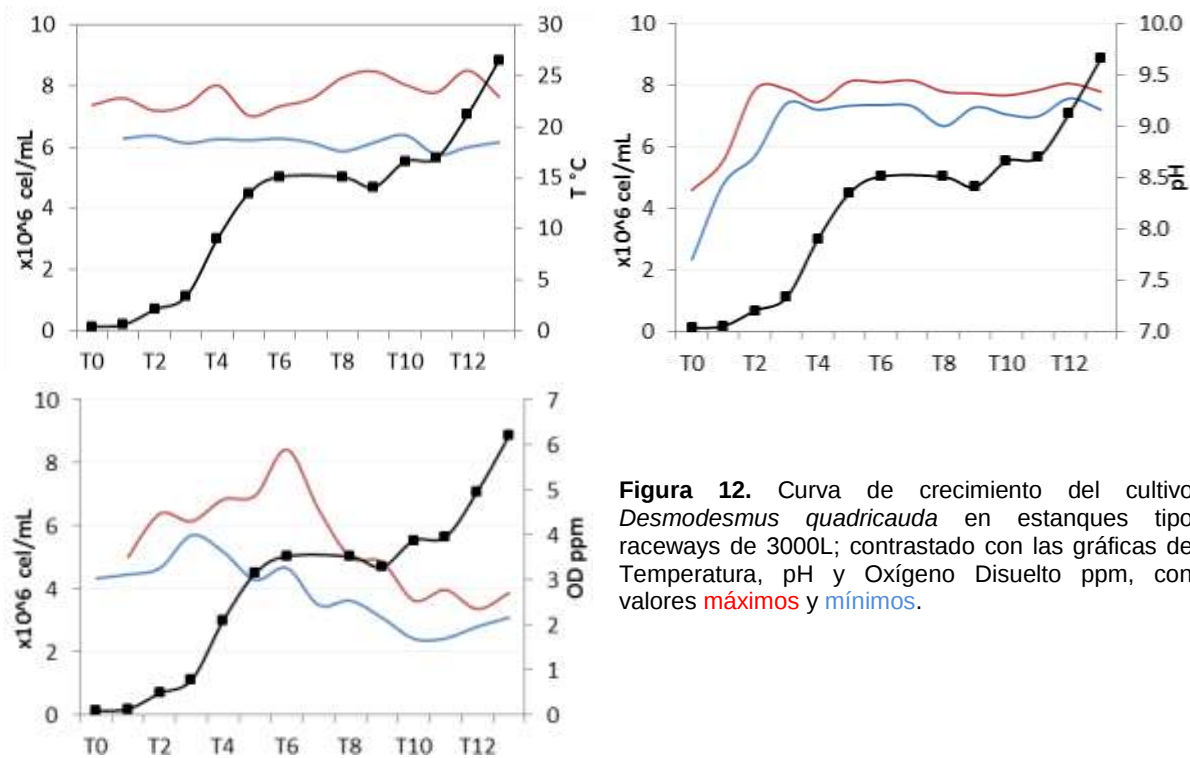


Figura 12. Curva de crecimiento del cultivo *Desmodesmus quadricauda* en estanques tipo raceways de 3000L; contrastado con las gráficas de Temperatura, pH y Oxígeno Disuelto ppm, con valores **máximos** y **mínimos**.

Tabla IX. Densidades celulares por sistema de cultivo.

Sistema de cultivo	# cel/mL
Columna	7,758,333
RWC	15,051,111
RWG	8,850,833

Se obtuvo un mejor rendimiento en los raceways de 300L, seguido de los sistemas de 3000L y fotobiorreactores.

La tasa de crecimiento (μ_2) se obtiene directamente en número de divisiones celulares o de duplicaciones diarias de biomasa, de acuerdo a la ecuación siguiente (Arredondo-Vega y Votolina, 2007).

$$\mu_2 = [\ln (X_2 / X_1) / \ln 2] / (t_2 - t_1)$$

Tabla X. Tasas de crecimiento de los cultivos de *Desmodesmus quadricauda*. Concentración celular, tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$).

Sistema	Columna	RWC	RWG	Columna	RWC	RWG	Columna	RWC	RWG
Tiempo (d)	N (cel/mL)			μ_2			$\Sigma\mu_2$		
1	128,037	290,939	136,250	--	--	--	--	--	--
2	179,722	520,000	191,250	0.4892	0.8378	0.4892	0.4892	0.8378	0.4892
3	629,167	1,891,389	692,917	1.8077	1.8629	1.8572	2.2969	2.7007	2.3464
4	2,694,444	4,270,000	1,117,917	2.0985	1.1748	0.6901	4.3954	3.8754	3.0365
5	3,268,056	5,011,667	3,001,667	0.2784	0.2311	1.4250	4.6738	4.1065	4.4614
6	3,406,944	5,883,333	4,487,500	0.0600	0.2313	0.5801	4.7338	4.3378	5.0416
7	4,183,333	6,701,667	5,037,500	0.2962	0.1879	0.1668	5.0300	4.5257	5.2084
8	5,283,333	7,520,000	5,030,833	0.3368	0.1662	-0.0019	5.3668	4.6919	5.2065
9	5,886,111	9,850,000	5,024,167	0.1559	0.3894	-0.0019	5.5227	5.0813	5.2046
10	6,608,333	10,578,333	4,695,833	0.1670	0.1029	-0.0975	5.6896	5.1842	5.1071
11	7,758,333	11,619,444	5,537,500	0.2315	0.1354	0.2379	5.9211	5.3197	5.3449
12		13,383,333	5,647,083		0.2039	0.0283		5.5236	5.3732
13		15,051,111	7,085,833		0.1694	0.3274		5.6930	5.7006
14			8,850,833			0.3209			6.0215

5.1.2. Tasas de crecimiento celular

La tasa máxima de crecimiento (2.09 día^{-1}) obtenida en fotobiorreactores en columna (tabla X), es mayor a los demás sistemas de cultivo; los cuales comparten una tasa de crecimiento de 1.8 día^{-1} , teniendo como máximo para fotobiorreactores 7.7×10^6 células por mililitro; comparada con la obtenida por raceways chicos que es de $15 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ (tabla X)

Para cultivos de *Desmodesmus quadricauda* en fotobiorreactor en columna como en raceways las tasas de crecimiento celular son menores después del cuarto o quinto día. En el caso de los raceways de 300L se mantuvo en fase exponencial.

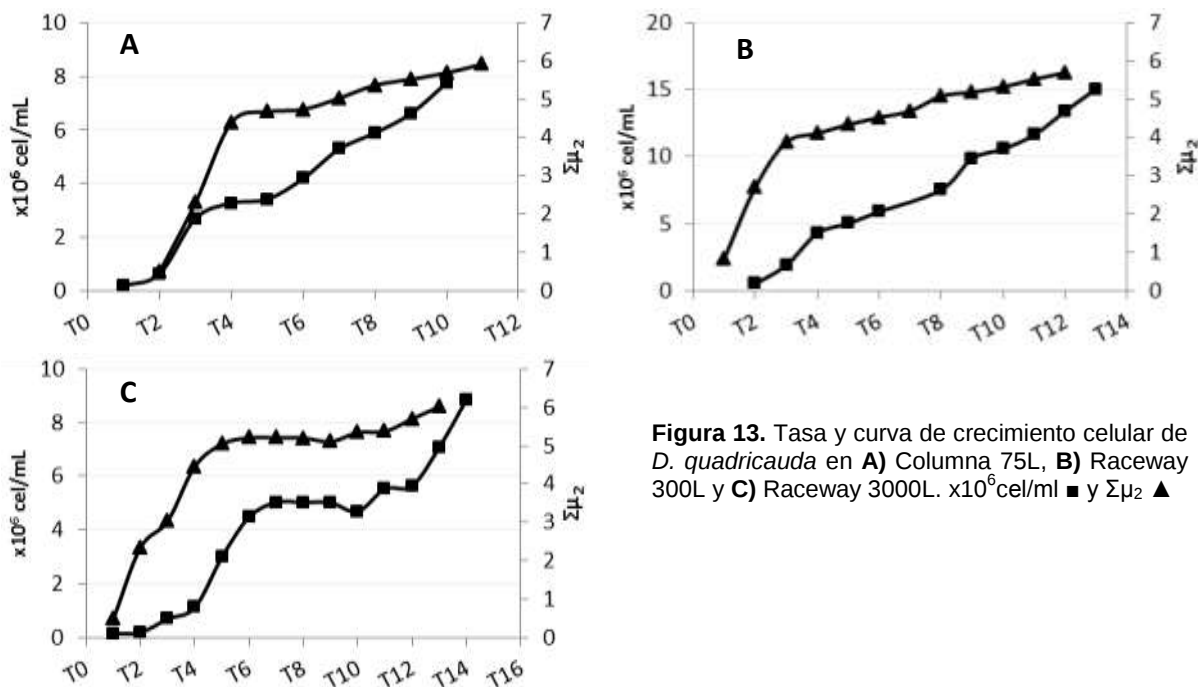


Figura 13. Tasa y curva de crecimiento celular de *D. quadricauda* en **A)** Columna 75L, **B)** Raceway 300L y **C)** Raceway 3000L. $\times 10^6 \text{ cel/ml}$ ■ y $\Sigma\mu_2$ ▲

5.2. *Chlorella vulgaris*

5.2.1. Parámetros de cultivo

Para los cultivos a gran escala de *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactores y raceways de 300L el pH fluctuó entre valores de 7.7 a 8.6. Con respecto a la temperatura en los fotobiorreactores los días T7 y T8 se registraron fluctuaciones desde 16° hasta 37.5°; en los raceways la variación fue de 11° de T6 a T10.

La tendencia del OD (ppm) se presentó estable entre 2.3 a 3.9 a lo largo del cultivo en fotobiorreactores y de 2.9 - 4.7 en raceways (Fig. 14).

Tabla XI. Densidades celulares por sistema de cultivo de *C. vulgaris*.

Sistema de cultivo	# cel/mL
Columna	6,993,333
RWC	1,519,444

Se logró mayor rendimiento en los fotobiorreactores en columna de 75L con casi 7 millones de cel/mL.

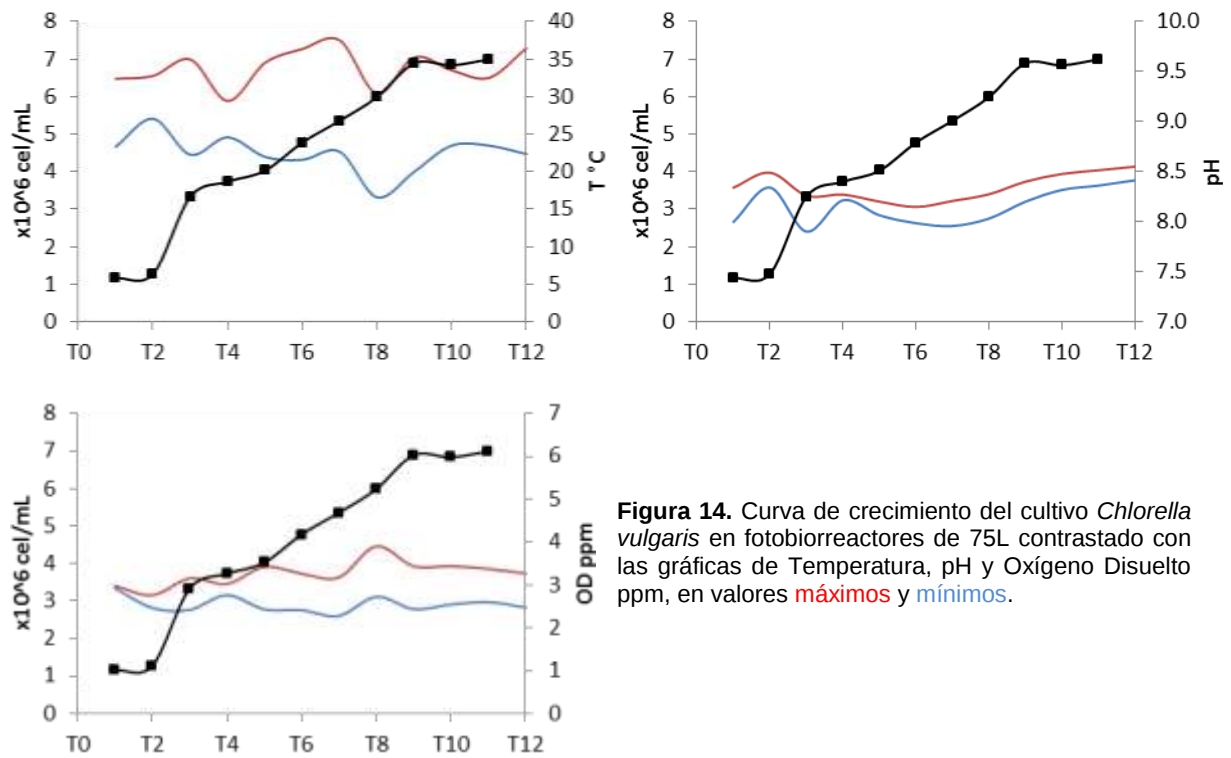


Figura 14. Curva de crecimiento del cultivo *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactores de 75L contrastado con las gráficas de Temperatura, pH y Oxígeno Disuelto ppm, en valores **máximos** y **mínimos**.

En los cultivos de *Chlorella* en raceways chicos se encontró contaminación por ciliados (Fig. 15).



Figura 15. Ciliado. Contaminación por ciliados en cultivos raceways de *Chlorella vulgaris*.

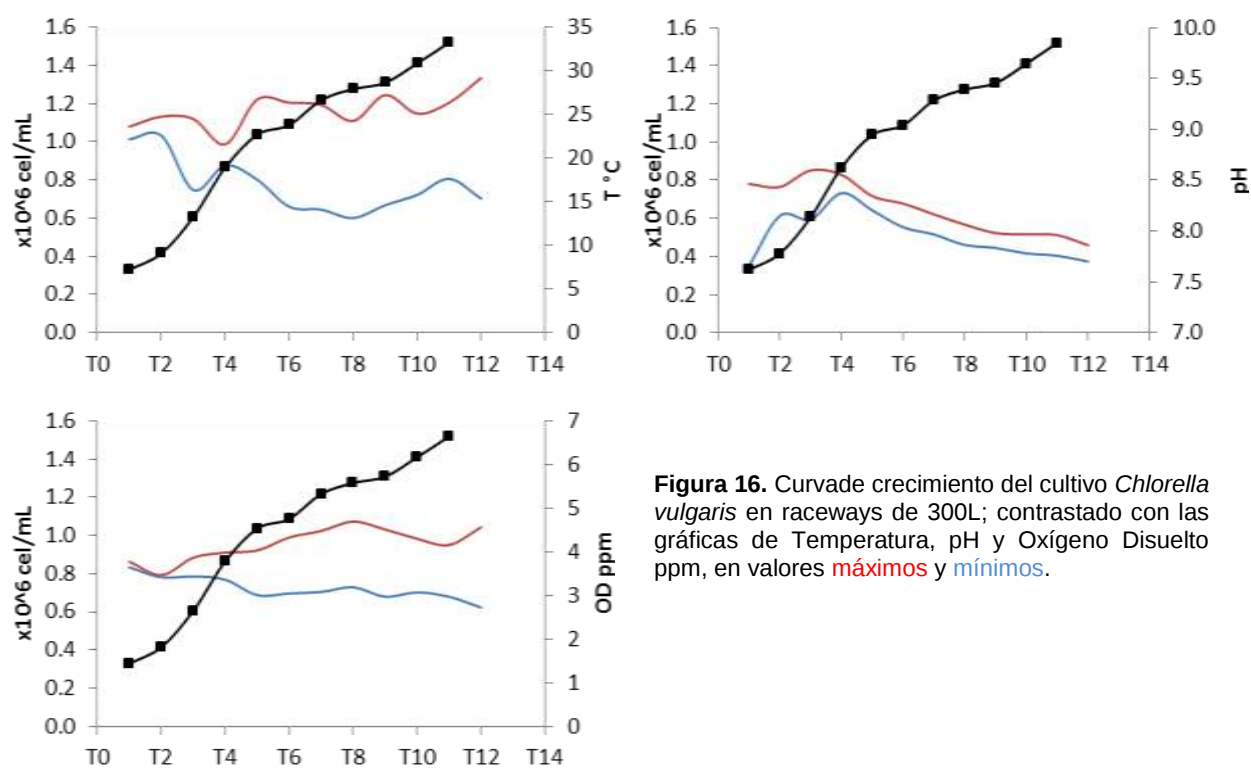


Figura 16. Curvade crecimiento del cultivo *Chlorella vulgaris* en raceways de 300L; contrastado con las gráficas de Temperatura, pH y Oxígeno Disuelto ppm, en valores **máximos** y **mínimos**.

5.2.2. Tasas de crecimiento celular

Tabla XII. Tasa de crecimiento de los cultivos de *Chlorella vulgaris*. Concentración celular, tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$)

Sistema	Columna	RWC	Columna	RWC	Columna	RWC
Tiempo (d)	N (cel/mL)		μ_2		$\Sigma\mu_2$	
1	1,155,556	329,444	--	--	--	--
2	1,271,111	415,278	0.1375	0.3340	0.1375	0.3340
3	3,328,889	605,833	1.3890	0.5448	1.5265	0.8789
4	3,730,000	865,278	0.1641	0.5142	1.6906	1.3931
5	4,025,556	1,036,944	0.1100	0.2611	1.8006	1.6542
6	4,775,556	1,087,778	0.2465	0.0690	2.0471	1.7233
7	5,355,556	1,217,778	0.1654	0.1629	2.2124	1.8861
8	5,986,667	1,275,556	0.1607	0.0669	2.3732	1.9530
9	6,888,889	1,308,889	0.2025	0.0372	2.5757	1.9902
10	6,835,556	1,410,556	-0.0112	0.1079	2.5645	2.0982
11	6,993,333	1,519,444	0.0329	0.1073	2.5974	2.2054

En cultivos de *Chlorella* la mayor tasa de crecimiento se registra en sistemas de columna (1.389 día^{-1}) al tercer día después de una fase de adaptación y con concentración celular máxima de $7 \times 10^6 \text{ cel/mL}$ al final del cultivo, mientras que la mayor tasa de crecimiento en raceways es de 0.545 día^{-1} , posiblemente como resultado de la contaminación por ciliados (figura 15).

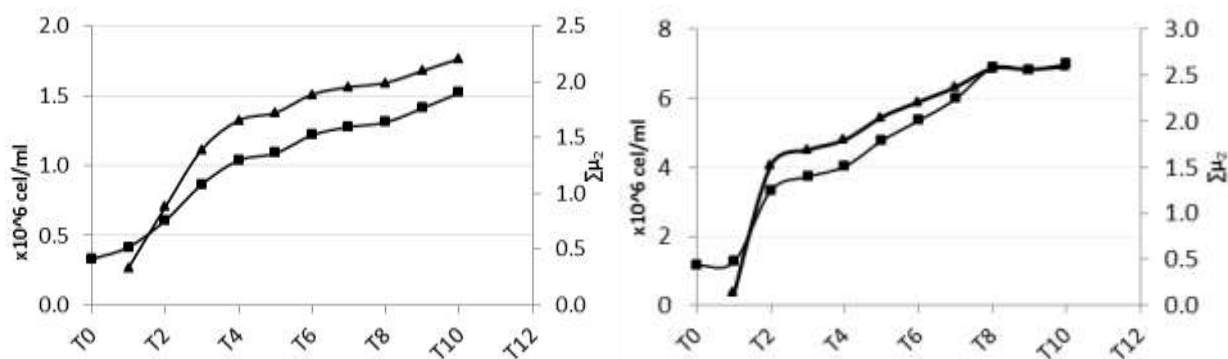


Figura 17. Tasa y curva de crecimiento celular de *C. vulgaris* en **A)** Columna, **B)** Raceway 300L. $\times 10^6 \text{ cel/ml}$ ■ y $\Sigma\mu_2$ ▲.

5.3. Calidad de la biomasa algal

Se realizaron curvas de calibración de proteínas, carbohidratos y lípidos mediante los métodos de Lowry *et al.* (1951); Dubois *et al.* (1956); Bligh y Dyer (1959) y Marsh y Weinstein (1966) obteniendo de estas una regresión lineal con la cual se determinó la cantidad presente de macromoléculas en cada muestra. Figura X y XIII

Tabla XIII. Cantidad porcentual de proteínas, carbohidratos y lípidos de *Chlorella vulgaris*

	FBR		RWc	
	F. Exp ¹	F. Est ²	F. Exp ¹	F. Est ²
Proteína	26.16	23.89	26.48	24.33
Carbohidratos	12.08	-	-	-
Lípidos	4.19	5.78	-	-

¹ Muestra en fase de crecimiento exponencial.

² Muestra en fase de crecimiento estacionaria.

Tabla XIV. Cantidad porcentual de proteínas, carbohidratos y lípidos de *Desmodemus quadricauda*

	FBR		RWc		RWg	
	F. Exp. ¹	F. Est. ²	F. Exp. ¹	F. Est. ²	F. Exp. ¹	F. Est. ²
Proteína	21.66	18.98	21.63	19.7	25.82	8.83
Carbohidrato	-	18.77	9.67	15.12	9.95	10.10
Lípido	-	4.32	3.47	1.88	2.31	2.40

¹ Muestra en fase de crecimiento exponencial.

².Muestra en fase de crecimiento estacionaria.

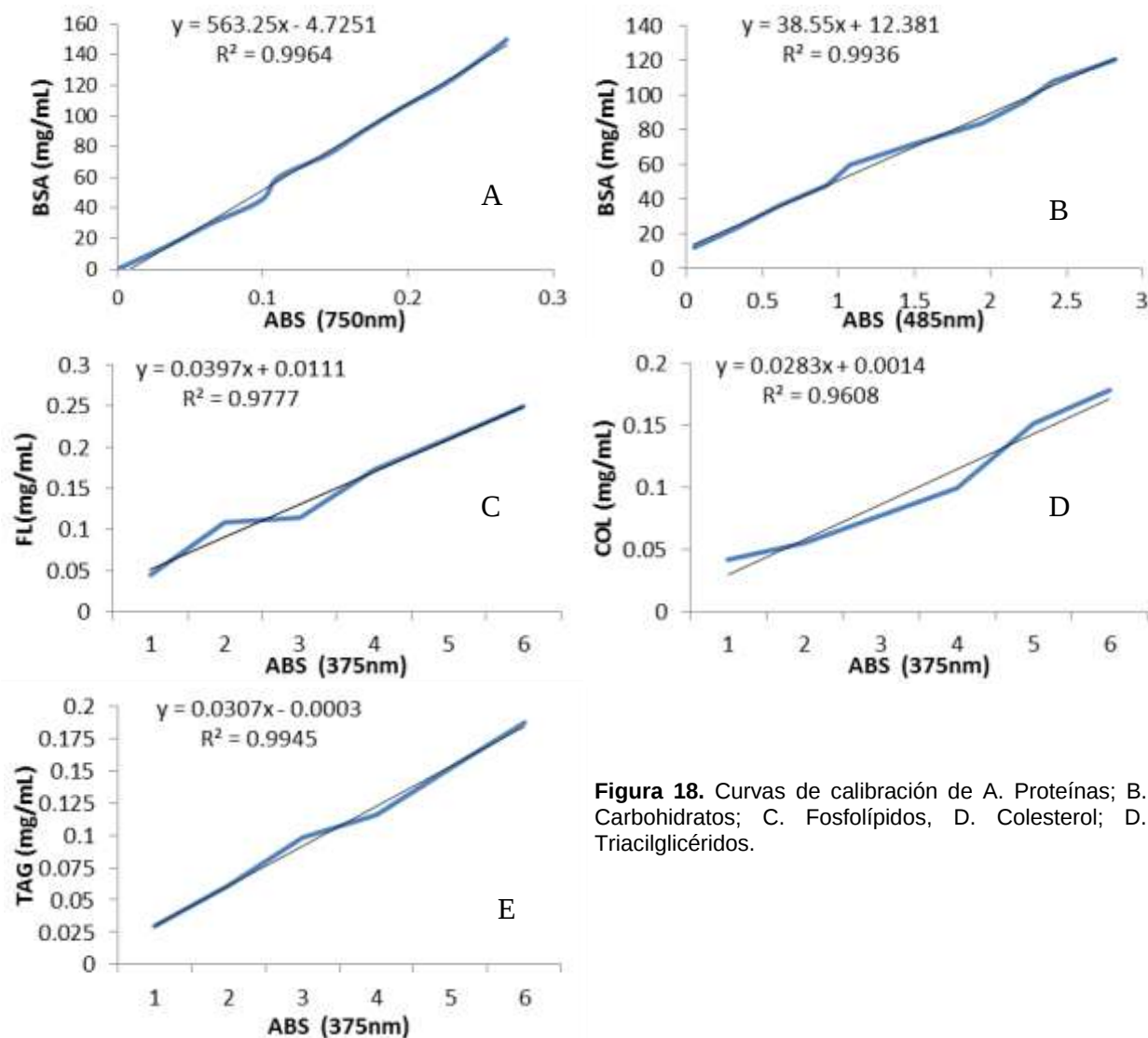


Figura 18. Curvas de calibración de A. Proteínas; B. Carbohidratos; C. Fosfolípidos, D. Colesterol; D. Triacilglicéridos.

5.4. Métodos de extracción de lípidos.

Tabla XV. Eficiencia de los métodos de extracción de lípidos para biodiesel

Solvente	Goldfish	Rose-Glotier	Reflujo
Hexano	3.19%	2.38%	13.13%

En los distintos procedimientos de extracción de lípidos el método por reflujo basado en el método Soxhlet fue el que presentó mayor rendimiento.

6 DISCUSIÓN

Para la producción masiva de microalgas en fotobiorreactores o raceways; se deben seleccionar especies que tengan altas tasas de crecimiento y tener una alta plasticidad metabólica a rangos amplios de condiciones de cultivo. En general la mayoría de las especies no se pueden mantener mucho tiempo en cultivos externos por el riesgo de contaminación por hongos, bacterias, protozoarios y por otras microalgas; como lo fue en su momento la contaminación de fotobiorreactores por ciliados en cultivos de *C. vulgaris* (Fig. 15).

6.1. Dinámica del crecimiento celular

Varios autores (Chen y Durbin, 1994; Kis *et al.*, 1998, Granum y Mykkestad, 2001; Ming-Li *et al.*, 2004; Guan-Qun y Chen, 2006; Durmaz *et al.*, 2007) han mostrado que la dinámica de crecimiento microalgal depende en gran medida de los parámetros de cultivo como la temperatura, el pH y la luz principalmente; los cuales se pueden tornar un factor limitante del crecimiento celular; llegando a niveles máximos y mínimos de tolerancia para las microalgas.

En este proyecto el crecimiento celular de cultivos microalgales presentó un aumento considerable dentro de los rangos óptimos de temperatura, que van desde los 18 a 25°C para la mayoría de las microalgas y por encima de las temperaturas óptimas, el crecimiento celular disminuyó llegando a cero. Para *Desmodesmus quadricauda* se han encontrado trabajos que manejan temperaturas que van de 20 a 25°C (Wiltshire *et al.*, 2000; Da Silva *et al.*, 2008; Quevedo *et al.*, 2008; Mandal y Mallick, 2009) y de 10 a 25°C para *Chlorella vulgaris* (Abalde *et al.*, 1995; Ming-Li *et al.*, 2004; Griffiths y Harrison, 2008).

Para los cultivos en columna de *D. quadricauda* (figuras10) los valores de temperatura superaron al rango óptimo, ya que la variación de temperatura promedio (18-25°C) fue mayor, de 15°C a lo largo del día, debido a las diferencias en temperaturas que existen entre el día y la noche, partiendo de 20.7°C por las mañanas y llegando hasta 37.9°C en las tardes en menos de 3 días (T1-T3) (Figura 10). Se observó un descenso de la tasa de crecimiento en fotobiorreactores, de 2.09 a 0.27 día⁻¹ en T4, un descenso de 1.82 en un día (tabla XII). Esta disminución de la tasa de crecimiento también se observa en raceways chicos en T7 y en raceways grandes en T8.

Para el caso de *C. vulgaris* la variación en temperatura en fotobiorreactores fue de 15°C, registrando 16°C por las mañanas y 37.5°C a media tarde; por el tiempo que duró esta variación de temperatura (T7-T8) (figura 14), la tasa de duplicación bajó de 0.24 a 0.16 día⁻¹; de igual forma se puede observar la disminución de la tasa de crecimiento en raceways chicos fue de 0.51 en T4 (el cuarto día) hasta 0.069 en T6, tiempo en que la temperatura llegó a variar 11°C (figura 16 y tabla XII).

El mantenimiento de la temperatura de los cultivos en el invernadero dentro del rango adecuado de crecimiento celular no fue posible ya que en este trabajo, tanto los fotobiorreactores en columna como los raceways estuvieron localizados en un invernadero con iluminación natural, con variaciones dadas naturalmente entre día y noche, resguardando de las corrientes de aire frío a los cultivos, pero con acumulación del calor, producido al permanecer todo el tiempo en pleno rayo de sol; haciendo que los sistemas cultivados aumentaran sus temperaturas; principalmente en sistemas de columna (figuras 10 y 14) en donde los cultivos llegaron a más de 35°C y aunado a esto, aumentó el proceso de respiración en la fase oscura registrado en OD, debido a las altas temperaturas.

Algunos estudios han mostrado que el crecimiento fotosintético de las microalgas provoca cambios en el pH del medio, determinando la solubilidad del CO₂ y de los minerales (Chen y Durbin, 1994). En el presente proyecto, el pH de todos los sistemas para *D. quadricauda* fluctuó a lo largo del cultivo entre 8.5 y 9.5; esto puede deberse a la asimilación de los nitratos que tiende a aumentar el pH. Abalde *et al.* (1995) mencionan que si el pH aumenta hasta 9, las moléculas con carbono pueden precipitarse, lo que conlleva una pérdida de los nutrientes del medio y una menor tasa de crecimiento.

Lo anterior puede inferirse ya que en los cultivos de *D. quadricauda* en fotobiorreactores, figura 10; el pH llegó a 9 al día 5 y al día 6 la concentración de oxígeno disuelto se estabilizó; en los cultivos raceways el pH sobrepasó el valor de 9, la concentración de OD a lo largo del cultivo fue en decremento a partir del quinto y sexto día (figuras 11 y 12). En los cultivos de *C. vulgaris* el pH no rebasó 8.6 y a diferencia de los cultivos con *D. quadricauda*, la concentración del oxígeno disuelto no presentó pérdidas en los sistemas (figuras 14 y 16) y presentó producción constante entre 2.3 a 3.9 (ppm) a lo largo del cultivo.

De igual manera, la aireación y mezcla del medio difiere en gran forma entre sistemas abiertos y cerrados. En fotobiorreactores se presentan tasas de turbulencia más altas, además de tener una superficie de 360° con una superficie transparente por la que ingresa la radiación fotosintéticamente activa (RFA) del espectro solar al sistema, cantidad de radiación capaz de producir actividad fotosintética. En sistemas raceway el ingreso de RFA se da solo en un plano menor a 180° (en la superficie del cultivo) y su turbulencia se genera mediante unas palas creando un flujo laminar que a cierto tamaño y densidad del cultivo determinará la profundidad de compensación (profundidad a la cual la actividad fotosintética y la actividad respiratoria se encuentran en equilibrio). Sin embargo

consideramos que esta variación en ambos sistemas no representó un factor limitante de crecimiento de los cultivos.

La biomasa microalgal se cosechó para su análisis de composición bioquímica a la mitad de la fase exponencial y al inicio de la fase estacionaria. Este último punto en la curva de crecimiento es importante ya que es aquí donde los compuestos de reserva como lípidos y carbohidratos, teóricamente se encuentran en su proporción más alta de la curva de crecimiento y aun no han sido metabolizados, para un mantenimiento celular. Por lo que dependiendo de la fase de crecimiento en que se encuentren *C. vulgaris* y *D. quadricauda* su perfil bioquímico puede variar. Para esto se analizó la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) contra el tiempo de cultivo; para el caso de *Desmodesmus quadricauda* y *Chlorella vulgaris* el momento óptimo de cultivo fue a partir del día 5 (figuras 13 y 16).

6.2. Perfil bioquímico

En el presente trabajo además de hacer un análisis de la cantidad de biomasa producida en cada sistema de cultivo se decidió hacer un análisis de la calidad de la misma, para determinar su posterior uso o aplicación.

Obtuvimos 23-26% de proteínas, 12% carbohidratos y 4.1-5.8% lípidos para *C. vulgaris* y *D. quadricauda* presentó mayores variaciones 8-25% en proteínas, 9.6-18.8% en carbohidratos y 1.8-4.3% de lípidos con respecto al peso seco total. Los valores obtenidos para ambas cepas no coinciden con los reportados en literatura (tablas XIII, XIV); aun así, las proporciones se mantuvieron siendo las proteínas el principal componente orgánico seguido de los lípidos y carbohidratos.

En *D. quadricauda*, tanto como en *C. vulgaris* se observa que la concentración de proteínas fue mayor para la fase estacionaria del modelo de crecimiento celular; cuando el contenido de nutrientes se encuentra en teoría prácticamente agotado.

D. quadricauda al llegar a la fase exponencial, etapa del crecimiento celular donde la concentración de N en el medio es menor; presentó decremento en el porcentaje de lípidos y aumento en carbohidratos, formas inmediatas de almacenamiento y consumo de energía.

Con relación a los carbohidratos obtuvimos valores bajos de carbohidratos de 9 a 18% en cultivo de *D. quadricauda* y de 12% en cultivo de *C. vulgaris* en relación al peso seco total y en cuanto a los lípidos fue de 1.8 a 4.32% para *D. quadricauda* y de 4.1 a 5.78% de *C. vulgaris*. Es generalmente aceptado que, dependiendo de las especies de microalgas, los lípidos y/o carbohidratos tiendan a acumularse en la fase estacionaria (Rosón, 2010) independientemente de las condiciones que acompañen a esta fase del crecimiento celular

La composición bioquímica de las microalgas comprende de 25-84% según Rosón (2010), en relación a proteínas, lípidos y carbohidratos respecto al peso

seco de su biomasa mientras que el porcentaje restante se encuentra subdividido entre distintas moléculas como clorofilas, carotenos, vitaminas hidro y liposolubles, enzimas, glicerol, aminos y otros compuestos de importancia menor. Los resultados obtenidos en la presente investigación, difieren de algunos resultados reportados en literatura (Becker, 1994; Abalde *et al.*, 1995; Grenwell *et al.*, 2009; Ronsón, 2010) en cuanto a los porcentajes de lípidos, carbohidratos y proteínas debido a que las condiciones y los medios de cultivo no son comparables y también hay que considerar la variación intrínseca de cada especie a estudiar.

Por tanto aunque se esperaba que como los lípidos son el reservorio energético almacenado en la célula en condiciones de estrés, al final del periodo de cultivo estuviese en mayores concentraciones (Tabla XIII y XIV) no se lograron valores muy concentrados de este componente.

Cabe señalar que tanto *D. quadricauda* como *C. vulgaris* lograron adaptarse a las condiciones de cultivo externas, tanto a temperaturas diurnas elevadas de $30\pm 4^{\circ}\text{C}$, como a periodos de lluvias, granizadas y frío ocasionales; exhibiendo en todo momento un cultivo unialgal en la mayoría de los casos. A pesar de ser cultivos de invernadero, no se observó presencia de otras especies de microalgas o de cianobacterias contaminantes u oportunistas, salvo un organismo ciliado, que no detuvo el desarrollo de los cultivos.

6.3. Extracción de lípidos.

La cosecha y la extracción de la fracción lipídica de la biomasa microalgal son las etapas más caras y problemáticas de la producción a gran escala de la biomasa y pueden llegar a determinar la sostenibilidad del proceso de producción. Dentro de los tres métodos efectuados para obtener la mayor eficiencia de extracción en lípidos, el mejor fue por reflujo basado en el Método Soxhlet (Tabla XV) (Demirbas, 2009).

Esta última fue realizada con hexano un solvente apolar, alcanzando 13.13% de recuperación. Aunque el resultado por reflujo nos presente mayor obtención de lípidos no es suficiente el utilizar sólo el hexano, ya que es un solvente no polar y la mayoría de los lípidos microalgales son lípidos polares, que son componentes de membranas y triglicéridos

7 CONCLUSIONES

En el presente proyecto experimental los sistemas de cultivo cerrado o fotobiorreactores presentaron una producción celular más estable aprox. de 7×10^6 cel/mL en comparación con cultivos desarrollados en raceways.

Por otro lado, los sistemas raceways pueden manejar mayor volumen de cultivo obteniendo hasta 15×10^6 cel/mL en el caso de *D. quadricauda*.

En la producción de microalgas a escala planta piloto, es necesario proveer de volúmenes de inóculo concentrado mediante fotobiorreactores, para cultivos en raceways de mayor volumen, para garantizar la dominancia de las cepas microalgales blanco y mejorar rendimientos.

La temperatura y el pH fueron los principales factores que influyeron en el desarrollo de los cultivos.

La especie de *Desmodesmus quadricauda* presentó menor producción de lípidos pero presentó mayores concentraciones celulares en el mismo tiempo de cultivo, sin presencia de organismos depredadores u oportunistas; por lo que de entre las dos especies utilizadas en el presente trabajo, es la más recomendable para seguir experimentando y lograr mayor producción de lípidos susceptibles de transformarse en biodiesel.

El método soxhlet fue el que nos brindó mayor rendimiento para extracción de lípidos en biomasa microalgal de *D. quadricauda*.

Es conveniente trabajar con microalgas nativas y no con especies compradas en ceparios extranjeros, ya que estas se adaptan fácilmente a las condiciones ambientales de la región, además que evitamos la introducción de especies exóticas con el subsecuente daño al ecosistema.

El uso de fertilizantes como medio de cultivo para cultivos a gran escala, demostró ser eficiente y además es un medio económico y de fácil acceso para quienes quieran hacer de esto una actividad redituable.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ABALDE J., A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero. 1995. **Microalgas: Cultivo y Aplicaciones**. Universidad de Coruña. 210p.
- AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists Official methods of analysis. **In. Food Composition, additives, natural contaminants. V II.** Ed. Kenneth Helrich. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, Estados Unidos. 1096p.
- ARREDONDO-VEGA, B.O. y D. Votolina (eds.). 2007. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. CIBNOR. 97p.
- AULLON A.A. 2010. **Biodiesel from microalgae**. Tesis de grado. Royal School of Technology. Stockholm, Suecia. 92p.
- BARBOSA, M.J.G.V. 2003. **Microalgal photobioreactors: Scale-up and optimization**. Ph.D. Thesis. Wageningen University. Wageningen, Netherlands. 168p
- BARRAZA, C., V. Collao, C. Espinoza, F. Moya, G. Thun y M. Torres. 2009. **Producción de biodiesel a partir de microalgas**. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. 26p.
- BECKER E.W. (Ed). 1994. **Biotechnology and Microbiology**. Cambridge University, Press Cambridge. 293p.
- BEN-AMOTZ, A. 2009. Bio-fuel and CO₂ capture by algae. ANR meeting on «**Third Generation Biofuels**» - February, 5th. Paris, France. 45p.
- BENEMANN J.R.; Weissman, J.C.; Koopman, B.L.; Oswald, W.J. 1977. Energy production by microbial photosynthesis. **Nature**, 268:19-23pp.
- BERG J.M., J.L. Tymoczko & L. Stryer. 2002. **Biochemistry**. 5a Edition. W.H. Freeman. New York, 1050 pp.
- BLIGH G.E., & Dyer, J.W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. 37(3): 911-917pp.
- BOROWITZKA M.A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **J. Biotechnol.** 70: 313–321pp.
- BOROWITZKA M.A., 1988. Fats, Oils and Hydrocarbons. **Micro-Algal Biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 257-287pp.
- BROWN L.M., Sprague, S., Jarvis, E.E., Dunahay, T.G., Roessler, P.G., & Zeiler, K.G. 1993. **Biodiesel From Aquatic Species Project Report: FY**. 38pp.
- CANO M., Zaccaro de Mulé M.C., Caire G., Halperin D. 1993. Biofertilization of rice plants with the cyanobacterium *Tolypothrix tenuis* (40d). **Int. J. Exp. Bot. (Phyton)**. 54(2): 149-155pp.
- CHEN C.Y. & E.G. Durbin. 1994. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. **Marine Ecology Progress Series**. 109: 83-94pp.

- CHIN Y., Z. Yaakob, E. Ali, A. Min-Min & Ng Sheng Wa. 2011. Characterization of various microalgae for Biodiesel Fuel Production. **Journal of Materials Science and Engineering**. 1:80-86pp.
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. 25: 294-306pp.
- COHEN Z.M. 1986. Products from microalgae. En: Richmond A. (Ed) 2004. **Handbook of microalgal mass culture**. CRC Press Boca Raton Florida.421-54pp.
- DA-SILVA T.L., A. Reis, R Medeiros, A.C. Oliveira & L. Gouveia. 2008. Oil Production Towards Biofuel from Autotrophic Microalgae Semicontinuous Cultivations Monitorized by Flow Cytometry. **Appl Biochem Biotechnol**. 159(2): 568-578pp.
- DE B.K., Chaudhury S., y Bhattacharyya D.K. 1999. Effect of nitrogen sources on γ -linoleic acid accumulation in *Spirulina platensis*. **JAACS**. 76(1):156p.
- DELGADO L.E. y V.H. Marín. 2006. Determinación de zonas de alta concentración de clorofilas en la región norte de los fiordos y canales australes por medio de sensoramiento remoto. **Cienc. Tecnol. Mar.** 29 (2): 87-94pp.
- DEMIRBAS A. & M. F. Demirbas. 2010. **Algae Energy, Algae as a New Source of Biodiesel**. Springer-Verlag London. 199p.
- DEMIRBAS A. 2009. Production of biodiesel from Algae Oils. **Energy Sources**, Part A31:163-168pp.
- DERNER B.R., Ohse S., Villela M., Matos de Carvalho S. y Fett R. 2006. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciencia Rural, Santa María**. 36(6): 1959-1967pp.
- DUBOIS, M., Gilles, K.A. Hamilton, J.K. Rebers, P.A. & Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**. 28:350-356pp.
- DURMAZ Y., M. Monteiro, N. Bandarra, Ş. Gökpınar & O. Işık. 2007. The effect of low temperature on fatty acid composition and tocopherols of the red microalga, *Porphyridium cruentum*. **Journal of Applied Phycology**.19:223–227pp.
- EDDING M., F. Tala y J. Vásquez. 2006. Fotosíntesis, productividad y algas marinas. En. **Fisiología Vegetal**. Squeo F.A. y L. Cardemil (Eds). Ediciones Universidad de la Serena, Chile.11: 39p.
- FOLEY, W. & B. Moore. 2005. Plant secondary metabolites and vertebrate herbivores-from physiological regulation to ecosystem function. **Current Opinion in Plant Biology**.8(4): 430-435pp.
- GARIBAY H. A. 2008. **Evaluación de condiciones de cultivo en la producción de lípidos con el alga *Neochloris oleoabundans* para su uso potencial como biodiesel**. Tesis de maestría.UNAM. 136p.
- GONG Y. & M. Jiang. 2011. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. **Biotechnol Lett**. 33:1269–1284pp.
- GOUVEIA L. & A.C. Oliveira. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. **J.Ind. Microbiol. Biotechnol**. 36:269-274pp.
- GRANUM E. & Myklestad S.M. 2001. A photobioreactor with pH control: demonstration by growth of the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Journal of Plankton Research**. 24(6): 557-563pp.

- GREENWELL H.C., L.M.L. Laurens, R.J. Shields, R.W. Lovitt & K.J. Flynn. 2009. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **J.R. Soc. Interface**. 19p.
- GRIFFITHS M.J. & S.T.L. Harrison. 2008. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. Springer. **J. Appl. Phycol.** 15p.
- GRIFFITHS M.J., R.P. Van Hille & S.T.L. Harrison. 2011. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. **J Appl Phycol.** 13p.
- GROBBELAAR J.U. 2009. Factors governing algal growth in photobioreactors: the "open" versus "closed" debate. **J. ApplPhycol.** 21:489-492pp
- GROBBELAAR J.U. 2011. Microalgae mass culture: the constraints of scaling-up. **J ApplPhycol.** 4p
- GROBBELAAR J.U., L Nedbal & V. Tichy.1996. Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photo acclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. **J Appl Phycol.**8: 335-343pp.
- GUAN-QUN C. & F. Chen. 2006. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology Letters**. 28: 607–616 pp.
- GUSCHINA I.A. & Harwood L.J. 2006.Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**.45:160-186pp.
- HAY M.E. & W. Fenical. 1992. Plant Animal Interactions in Marine Bentos (D.M. John) **Systematic Ass. Special**. 36: 319-333pp.
- HINZPETER I, C. Shene y L. Masson.2006. Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. **International Journal of Fats and Oils**. 57(3): 336-342pp
- ILLANA C. 2008. Uso industriales de las algas diatomeas. Art. de divulgación científica en **Quercus**. España. 32-37pp
- JOSEPH V. & Joseph A. 2001. Microalgae in Petrochemical Effluent: Growth and Biosorption of Total Dissolved Solids. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 66: 522–527pp.
- KIS M., O. Zsiros, T. Farkas, H. Wada, F. Nagy & Z. Gombos. 1998. Light-induced expression of fatty acid desaturase genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95:4209–4214pp.
- KYLE D.J. 1991. Speciality oils from Microalgae: new perspectives. In: **Biotechnology of Plant Fats and Oils**. J. Rattray (ed) American Oil Chemists Society. Champaign, Illinois. Cap. 8: 130-143pp.
- LARDON L., A. Elias, B. Sialve, J-P. Steyer & O. Bernard. 2009. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. **Environmental Science & Technology**. 43(17):6475-6481pp.
- LI Y.,M.Horsman, N. Wu, C.Q. Lan & N Dubois-Calero. 2008. Articles:Biocatalysts and bioreactor design. **Biotechnology Progress**. 24: 815-820pp.
- LOERA-QUEZADA M.M. y E.J. Olguín. 2010. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. **Rev. Latinoam Biotecnol Amb Algal**. 1(1):91-116pp

- LOWRY O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**. 193:265-272pp.
- MA, J. 2009. **Microalgae for biodiesel, CO₂ capture and wastewater treatment**. UNLV Renewable Energy Symposium.
- MADIGAN M.T., J.M. Martinko & J. Parker 2004. **Brock, Biología de los microorganismos**. 10ª Edición. Prentice Hall. 1089p.
- MAESTRINI, S.Y., Bonin, D. J., & Droop M.R. 1984. Phytoplankton as indicators of seawater quality: bioassay approach and protocols. En Shubert Elliot (ed.). **Algae as Ecological Indicators**. Academic Pres. Inc. (London) LTD: 71-132pp.
- MANDAL S. & N. Mallick. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Appl Microbiol Biotechnol**. 84:281-291pp
- MARSH, B. J. & Weinstein, B. D. 1966. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of Lipid Research**. 7: 574-576pp.
- MELIS A. 2002. Green algae hydrogen production: progress, challenges and prospects. **Int J. Hydrogen Energy**. 27: 1217-28pp.
- MING-LI T., Wan-Loy C., H. Marchant & Siew-Moi Phang. 2004. Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. **Journal of Applied Phycology**. 16: 421-430pp.
- MOLINA-GRIMA E., A. Fernandez F.G. & Robles Medina A. 2004. Downstream processing of cell-mass and products. En: **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Richmond A. (ed.) Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. 215-251pp.
- MONTECINO V. y G. Pizarro. 2006. Productividad primaria, biomasa y tamaño del fitoplancton en canales y fiordos australes: patrones primavera-verano. En. **Avances en el conocimiento oceanográfico de las aguas interiores chilenas**. N. Silva y S. Palma (eds.) 93-97pp.
- OLVERA-RAMÍREZ R. y García C.M.T. 1994. **Aislamiento y Caracterización de cianobacterias fijadoras de nitrógeno y su uso como biofertilizante**. Memorias del Ciclo de Conferencias México-Cuba. 16p.
- PEÑA Castro J.M., Martínez Jeronimo F.; Esparza García F. & Cañizares Villanueva R.O. 2004. Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures. **BioresourceTechnology** 94 : 219-222pp.
- PIRT S.J., Lee Y.K., Walach M.R., Pirt M.W., Balyuzi H.H.M., & Bazin, M.J. 1983. A tubular photobioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. **J. Chem. Tech. Biotechnol**. 33B: 35-38pp.
- PROSPERI C.H., & Fernandez-Valiente E. 1993. Influence of pH, light intensity and oxygen on the short-term effect of ammonium on nitrogen as activity of cyanobacteria from rice fields. **Environmental and Experimental Botany**. 33(4) : 545 -552pp.

- QIANG H., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert & A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feed stocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**. Vol 54(4): 621–639pp
- QUEVEDO O.C., Morales V.S., y Acosta C.A. 2008. Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica** 15(1): 25-31pp.
- RICHMOND A. 2004. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science. 577pp.
- RODOLFI L., G.C. Zitelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, & M.R. Tredici. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnol Bioeng**. 102(1):100-112pp.
- ROMERO T. y Suarez G. 2001. **Resultados orientados al uso de *Chlorella* sp. cultivada en aguas residuales de la Industria Pesquera Cubana**. Compacto ISSN de II Taller Internacional CONyMA. 16p
- RONSON P.J.A. 2010. **Modificación de la transferencia de nutrientes en la cadena nutritiva microalga-rotífero y microalga-artemia mediante cambios en la formulación de los nutrientes en el cultivo microalgal**. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. 546p
- ROSALES-LOAIZA N., M Guevara, C. Lodeiros y E. Morales. 2008. Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. **Int. J. Trop. Biol**. 56(2): 421-429pp.
- ROSENBERG, J.N., Oylerl G.A., Wilkinson L., & Betenbaugh M.J. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Curr Opin Biotechnol**. 19(5):430-436pp.
- SÁNCHEZ-MIRÓN A, Cerón-García M.C., Contreras-Gómez A, García-Camacho F, Molina-Grima E, & Chisti Y. 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. **Biochem Eng J**. 16:287–97pp.
- SAZDANOFF N. 2006. **Modeling and simulation of the algae to biodiesel fuel cycle**. Tesis de grado de Ingeniería Mecánica. Universidad de Ohio. 67p.
- SHEEHAN, J., Dunahay, T., Benemann, J. & Roessler, P. 1998. **A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program– Biodiesel from Algae**. National Renewable Energy Laboratory. 328p.
- SUÁREZ-GOMÉZ. 2004. **Estudio sobre toxinas marinas, aislamiento, elucidación estructural y evaluación de su potencial farmacológico**. Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna. 177p.
- TORZILLO G., Pushparaj B., Bocci F., Balloni W., Materassi R. & Florenzano G. 1986. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. **Biomass**. 11:61–74pp.
- UDUMAN, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Forde, G.M, Hoadley, A. 2010. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **J. Renewable Sustainable Energy**. 2: 15p.
- UGWU C.U., H. Aoyagi & H. Uchiyama. 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technol**. 99(10): 4021-4028pp.

- VALDÉS-IGLESIAS O., Pérez-Gil y Colom Y. 2010. Actividad antitumoral de los organismos marinos. **Medio Ambiente y Desarrollo**. No 19. 6p.
- VAZHAPPILLY R. & F. Chen. 1998. Eicosapentanoic acid and Docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. Vol 75.3:393-397pp
- VIEIRA-COSTA J.A. 2004. Produção de biodiesel a partir de microalgas. 1er Congreso Latinoamericano sobre Biotecnología Algal. Argentina. ISBN N° 987-1130-32-5
- WIDJAJA A. 2009. Lipid production from microalgae as a promising candidate for biodiesel production. **Makara, Teknologi**. 13(1):47-51pp.
- WIJFFELS R.H., Barbosa M.J., & Eppink M.H. 2010. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. **Biofuels, Bioproducts, & Biorefining**. 4: 287-295pp.
- WIJFFELS R.H. & Barbosa M.J. 2010. An outlook on microalgal biofuels. **Science**. 329:796-799pp.
- WILTSHIRE K., M. Boersma, A. Möller & H. Buhtz. 2000. Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). **Aquatic Ecology**. 34: 119–126pp.
- ZACCARO DE MULÉ M.C., Caire G., Cano M., Palma M., & Colombo K. 1999. Effect of cyanobacterial inoculation and fertilizers on rice seedlings and post-harvest soil structure. **Comm. Soil Sci. Plant Anal.** 30(1-2): 97-107pp.

ANEXO 1. Usos y productos de las microalgas

