



Instituto Politécnico Nacional

Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura
Unidad Profesional Ticomán



**PRODUCCIÓN DE BIODIESEL POR MICROALGAS, COMO
UNA ESTRATEGÍA DE FUENTES ALTERNAS DE
ENERGÍA**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN GEOCIENCIAS Y
ADMINISTRACIÓN DE RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

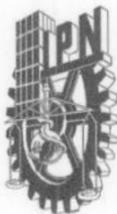
JESÚS FIDEL ARMENDÁRIZ GALVÁN

DIRECTOR DE TESIS INTERNO: DR. ARTURO ORTIZ UBILLA.

DIRECTOR DE TESIS EXTERNO: DRA. MYRIAM A. AMEZCUA ALLIERI.

México, D. F.

2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 20 de Mayo del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESIA, Ticomán en su sesión Ordinaria No. 4 celebrada el día 26 del mes de Abril conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Armendáriz

Galván

Jesús Fidel

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

B	0	9	1	7	0	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Producción de biodisel por microalgas, como una estrategia de fuentes alternas de energía"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Fuentes alternas de energía

Producción de Biodisel

Bioquímica

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Arturo Ortiz Ubilla (Director Interno) y a la Dra. Myriam A. Amezcua Allieri (Directora Externa)

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
Fuentes bibliográficas, medios electrónicos y trabajos de investigación de referencia

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dr. Arturo Ortiz Ubilla

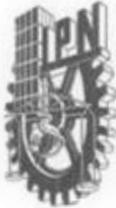
Aspirante

C. Jesús Fidel Armendáriz Galván

Dra. Myriam A. Amezcua Allieri

Presidente del Colegio

Ing. Julio Eduardo Morales de la Garza



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 14:30 horas del día 09 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESIA. U. Ticomán para examinar la tesis titulada:

"Producción de biodisel por microalgas, como una estrategia de fuentes alternas de energía"

Presentada por el alumno:

Armendáriz
Apellido paterno

Galván
Apellido materno

Jesús Fidel

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	7	0	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

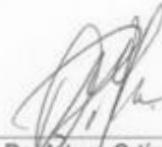
MAESTRÍA EN GEOCIENCIAS Y ADMINISTRACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

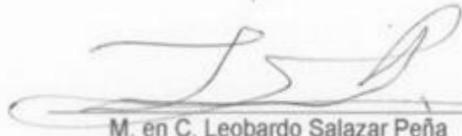
LA COMISIÓN REVISORA

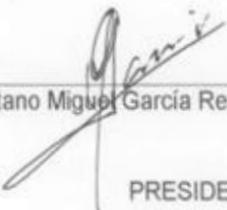
Directores de tesis


Dra. Myriam Adela Amezcua Allieri


Dr. Arturo Ortiz Ubilla


Dr. Daniel Romo Rico


M. en C. Leobardo Salazar Peña


Dr. Cayetano Miguel García Reyes

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Ing. Julio E. Mirales de la Garza



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 14 del mes Octubre del año 2011, el (la) que suscribe Jesús Fidel Armendáriz Galván alumno (a) del Programa de Maestría en Geociencias y Administración de Recursos Naturales con número de registro B091709, adscrito a SEPI-ESIA unidad Ticomán, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Arturo Ortiz Ubilla y Dra. Myriam Adela Amezcua Allieri y cede los derechos del trabajo intitulado "PRODUCCIÓN DE BIODIESEL POR MICROALGAS, COMO UNA ESTRATEGÍA DE FUENTES ALTERNAS DE ENERGÍA", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección fidelar69@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Jesús Fidel Armendáriz Galván

Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

José de Jesús Armendáriz Meléndez y Catalina Galván Morales

Como una muestra de mi cariño y agradecimiento, por todo el amor y apoyo brindado y porque hoy veo alcanzar otra de las metas de mi vida.

A mis hermanos:

Verónica, Ramón, Nora y Víctor Armendáriz Galván por la confianza y apoyo que siempre me han brindado.

A mi abuelita:

Sofía Meléndez Sevilla, por preocuparse por mí y ser como una segunda madre.

A mis cuñados:

José Aguilar, Alejandra Suárez y Diana. Porque siempre confiaron en mí y por el gran apoyo brindado.

A mis mejores amigos:

Gracias por su gran amistad.

Gracias a la Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura (ESIA) Unidad Ticomán del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por darme la oportunidad de formar parte como alumno de la Maestría en Geociencias y Administración de Recursos Naturales. Gracias por la formación recibida y a mis maestros por la gran aportación de conocimientos.

Al M en I. José Fidel Guadarrama por brindarme un lugar de trabajo en el laboratorio de corrosión para la realización de la tesis y las facilidades brindadas en el uso de equipo, material y reactivos.

A la Directora externa del presente trabajo, Dra. Myriam Adela Amezcua Allieri por su tiempo, confianza, paciencia, apoyo, motivación y total disposición para conmigo. Gracias por creer en mí.

A los revisores, al Dr. Arturo Ortiz Ubilla, Dr. Daniel Romo Rico, M en C. Leobardo Salazar Peña y al Dr. Miguel Cayetano Reyes García, quienes examinaron esta tesis, por sus comentarios y aportaciones que mejoraron este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de corrosión del Instituto Mexicano del Petróleo por su compañerismo. En especial y con mucho cariño a: Adriana Posadas Beltrán, Laura Mondragón Mora, Ignacio Sandoval Nava y Ruth Calderón Anaya.

A mis mejores amigos, quienes siempre han estado en los buenos y malos momentos. Gracias por su gran amistad, en especial a Daniel Arias, Adrián Hernández, Deysi y Abigail.

A toda la familia Canto Solís, con especial cariño a Guadalupe Jazmín Canto y Martín Alfonso Canto. Por su gran amistad, haber confiado en mí y por apoyarme en todo momento.

A toda la familia Armendáriz y Galván, por su gran apoyo moral y porque siempre en los momentos difíciles están a mi lado.

ÍNDICE

RESUMEN	Pág
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1 Importancia de las microalgas para la obtención de lípidos y producción de biodiesel	3
I.2 Problemática	4
I.3 Propuesta de solución	5
II. MARCO TEÓRICO	10
II.1 ENERGÍA RENOVABLES	10
II.1.1 Fuentes de energía	10
II.1.1.1 Energía solar	12
II.1.1.2 Energía eólica	13
II.1.1.3 Energía geotérmica	14
II.1.1.4 Energía hidráulica	14
II.1.1.5 Energía mareomotriz	14
II.1.1.6 Energía hidroeléctrica	15
II.1.1.7 Energía nuclear	15
II.1.1.8 Energía de biomasa	16
II.1.2 Bioenergía	16
II.1.2.1 Características de la bioenergía	17
II.1.2.2 Usos de la bioenergía	18
II.1.3 Biomasa	20
II.1.3.1 Tipos de biomasa	21
II.1.3.2 Usos energéticos de la biomasa	21
II.1.3.3 Tipos de aceites	21
II.1.3.4 Síntesis de lípidos de las microalgas	22
II.1.3.5 Técnicas de cosechado	23
II.1.3.6 Extracción de aceite (lípidos) en las microalgas	24
II.2 PRODUCCIÓN DE MICROALGAS COMO MATERIA PRIMA	25
II.2.1 Generalidades de las microalgas	25
II.2.2 Características particulares de las microalgas	26
II.2.3 Clasificación de las microalgas	27
II.2.3.1 División <i>Chlorophyta</i> (algas verdes)	27

II.2.3.1.1 Género <i>Chlorella</i>	28
II.2.4 Características taxonómicas de las microalgas bajo estudio	30
II.2.4.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	30
II.2.4.1.1 Principales usos	31
II.2.4.2 <i>Chlorella protothecoides</i>	32
II.2.5 Breve historia del cultivo de microalgas	32
II.2.6 Importancia del cultivo de microalgas	34
II.2.7 Las microalgas como nutrientes	37
II.2.8 Parámetros que regulan el crecimiento de las microalgas	39
II.2.9 Fases de crecimiento en el cultivo de microalgas	40
II.2.10 Especies de microalgas que producen aceite	41
II.2.10.1 Contenido de aceite de algunas especies de microalgas	41
II.2.11 Métodos de cultivo	43
II.2.12 Potencial de las microalgas para producir aceites	45
III. PROSPECTIVA DE LAS ENERGÍAS RENOVABLES	46
III.1 Barreras en el desarrollo de las Energías renovables en México	46
III.2 Prospectiva (visión hacia el 2030) de las Energías Renovables en México	47
III.3 Perspectiva a futuro de la producción de biomasa a través del cultivo de microalgas	48
IV. FASE EXPERIMENTAL	52
IV.1 Materiales y métodos para la fase experimental I	52
IV.2 Materiales y métodos para la fase experimental II	54
IV.3 Materiales y métodos para la fase experimental III	56
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
V.1 Fase experimental I	60
V.1.1 Medios de cultivo evaluados para el cultivo de <i>Chlorella protothecoides</i>	61
V.2 Fase experimental II	63
V.2.1 <i>Chlorella protothecoides</i> matraz de 1000 mL y garrafón de 20 litros (carboy)	65
V.2.2 <i>Chlorella vulgaris</i> matraz de 1000 mL y garrafón de 20 litros (carboy)	67
V.3 Fase experimental III	71
V.3.1 <i>Chlorella vulgaris</i> matraz de 1000 mL	71
V.3.2 <i>Chlorella vulgaris</i> garrafón de 20 litros (carboy)	75

V.3.3 <i>Chlorella protothecoides</i> garrafón de 20 litros (carboy)	81
V.3.4 <i>Chlorella vulgaris</i> escalamiento y sistema por triplicado (matraz Erlenmeyer de 1000 mL)	87
V.3.5 <i>Chlorella protothecoides</i> escalamiento y sistema por triplicado (carboy)	88
V.3.6 Composición de ácidos grasos (átomos de carbono)	89
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES	92
VI.1 Conclusiones y recomendaciones para la fase experimental I	92
VI.2 Conclusiones y recomendaciones para la fase experimental II	93
VI.3 Conclusiones y recomendaciones para la fase experimental III	94
VI.4 Comentarios finales	96
BIBLIOGRAFÍA	100
ANEXOS	
A. Técnicas analíticas utilizadas para la evaluación de la etapa experimental	110
B. Medios de cultivo líquidos, utilizados para el cultivo de microalgas	113
C. Tabla de datos experimentales registrados	118
D. Tabla del porcentaje en peso y espectrogramas	127

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

- Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Chlorella vulgaris*.
- Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Chlorella protothecoides*.
- Tabla 3. Contenido lipídico de algunas microalgas en condiciones autotróficas.
- Tabla 4. Contenido lipídico de algunas microalgas en condiciones autotróficas y heterotróficas.
- Tabla 5. Densidades celulares obtenidas para los dos sistemas evaluados (matraz y carboy) para la microalga *Chlorella protothecoides*.
- Tabla 6. Densidades celulares obtenidas para los dos sistemas evaluados (matraz y carboy) para la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Tabla 7. Densidades celulares obtenidas para los sistemas evaluados por triplicado (matraz Erlenmeyer de 1000 mL) para la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Tabla 8. Densidades celulares obtenidas para los sistemas evaluados por triplicado (carboy) para la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Tabla 9. Densidades celulares obtenidas para los sistemas evaluados por triplicado (carboy) para la microalga *Chlorella protothecoides*.
- Tabla 10. Composición (%) de ácidos grasos encontrados en *Chlorella protothecoides*.
- Tabla 11. Composición (%) de ácidos grasos encontrados en *Chlorella vulgaris*.

ANEXO

- Tabla A. Medio Basal de Bold (MBB) tomado de Stein, (1973) para *Chlorella vulgaris*.
- Tabla B. Medio de Basal de Bold Modificado para *Chlorella protothecoides*.
- Tabla C. Medio Watanabe para *Chlorella protothecoides*.
- Tabla D. Medio Watanabe con glucosa para *Chlorella protothecoides*.
- Tabla E. Medio Watanabe (bajo contenido de nitrógeno) para *Chlorella protothecoides*.
- Tabla F. Valores obtenidos de las cinéticas de crecimiento en los tres sistemas (matraz Erlenmeyer de 1000 mL) evaluados para *Chlorella vulgaris*.
- Tabla G. Valores obtenidos de las cinéticas de crecimiento en los tres sistemas evaluados (carboy) para *Chlorella vulgaris*.
- Tabla H. Valores registrados del comportamiento del pH durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.
- Tabla I. Valores obtenidos de las cinéticas de crecimiento en los tres sistemas evaluados (carboy) para *Chlorella protothecoides*.
- Tabla J. Valores registrados del comportamiento del pH durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.

- Tabla K. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales (ST) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.
- Tabla L. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales volátiles (STV) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.
- Tabla M. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales fijos (STF) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.
- Tabla N. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales (ST) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.
- Tabla Ñ. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales volátiles (STV) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.
- Tabla O. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales fijos (STF) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.

FIGURAS

- Figura 1. Representación esquemática de los diferentes medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *Chlorella protothecoides*.
- Figura 2. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella protothecoides* en tres diferentes medios de cultivo.
- Figura 3. Representación esquemática del escalamiento del cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Figura 4. Representación esquemática del escalamiento del cultivo de la microalga *Chlorella protothecoides*.
- Figura 5. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella protothecoides* en medio Basal modificado (matraz Erlenmeyer de 1000 mL) durante la fase de experimentación.
- Figura 6. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella protothecoides* en el garrafón de 20 litros de capacidad (carboy).
- Figura 7. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en medio Basal (matraz Erlenmeyer de 1000 mL) durante la fase de experimentación.
- Figura 8. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en medio Basal (carboy) durante la fase de experimentación.
- Figura 9. Representación esquemática del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en el sistema de cultivo.
- Figura 10. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella vulgaris* para los sistemas evaluados.
- Figura 11. Comportamiento de los sólidos totales (ST) registrados durante toda la fase de evaluación.

- Figura 12. Comportamiento de los sólidos suspendidos totales (SST) registrados durante toda la fase de evaluación.
- Figura 13. Representación esquemática del cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* desde la inoculación hasta la obtención de aceite en los sistemas carboy (triplicado).
- Figura 14. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en los tres sistemas (carboy) evaluados.
- Figura 15. Comportamiento del pH registrado durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.
- Figura 16. Comportamiento de los sólidos totales (ST) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.
- Figura 17. Comportamiento de los sólidos totales volátiles (STV) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.
- Figura 18. Comportamiento de los sólidos totales fijos (STF) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.
- Figura 19. Representación esquemática del cultivo de la microalga *Chlorella protothecoides* desde la inoculación hasta la obtención de aceite en los sistemas carboy (triplicado).
- Figura 20. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella protothecoides* en los tres carboy evaluados.
- Figura 21. Comportamiento del pH registrado durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.
- Figura 22. Comportamiento de los sólidos totales (ST) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.
- Figura 23. Comportamiento de los sólidos totales volátiles (STV) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.
- Figura 24. Comportamiento de los sólidos totales fijos (STF) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.

ANEXO

- Figura A. Cámara de Neubauer para el conteo celular.

RESUMEN

En las últimas cuatro décadas, la sociedad ha decidido disminuir su dependencia al petróleo y al carbón. Esta problemática hace ver a la energía renovable con una mayor proyección en el futuro. Dentro de este rubro se encuentra la bioenergía, que es la conversión de biomasa en combustibles (biodiesel y bioetanol) para la generación de energía. Actualmente la idea de utilizar biomasa de microalgas crea expectativas y confianza en una solución a corto plazo, siendo considerada la primera forma económica de producir biomasa, obtención de aceites y producción de biodiesel, debido a que el costo es menor que los procesos convencionales.

Inicialmente se evaluó el crecimiento de la microalga *Chlorella protothecoides* en diferentes medios de cultivo, encontrándose que el Medio Basal de Bold modificado es el más apropiado para el cultivo de la microalga. Posteriormente se evaluó el crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* a nivel de escalamiento, iniciando desde la purificación de la cepa, crecimiento en tubo de ensayo, matraz Erlenmeyer de 100, 500 y 1000 mL hasta un garrafón de 20 litros. Los resultados para ambas especies de microalgas mostraron un buen crecimiento, existiendo un aumento en los sólidos totales (mayor productividad de biomasa).

Los cultivos para *Chlorella protothecoides*, se iniciaron con una densidad celular de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹ (matraz y garrafón). El crecimiento presentó una tendencia similar (matraz y garrafón), con una fase de latencia que culminó el día 7 ($5,95 \times 10^5$ cel mL⁻¹) (matraz) y de $1,42 \times 10^5$ cel mL⁻¹ en el día 3 (garrafón); la fase exponencial duró 29 días ($9,48 \times 10^6$ cel mL⁻¹) (matraz) y de $1,10 \times 10^6$ cel mL⁻¹ de 16 días (garrafón). La fase estacionaria se presentó después de los 30 días ($9,42 \times 10^6$ cel mL⁻¹) (matraz) y de $2,80 \times 10^6$ cel mL⁻¹ a partir del día 24 (garrafón).

Para *Chlorella vulgaris*, los cultivos se iniciaron con una densidad celular de $5,00 \times 10^4$ cel mL⁻¹ (matraz) y de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹ (garrafón). El crecimiento presentó una tendencia similar de crecimiento, con una fase de latencia que culminó el día 2 ($5,28 \times 10^5$ cel mL⁻¹) (matraz) y de $1,16 \times 10^5$ cel mL⁻¹ en el día 4 (garrafón); la fase exponencial duró 13 días ($2,50 \times 10^7$ cel mL⁻¹) (matraz) y $1,11 \times 10^7$ cel mL⁻¹ de 33 días (garrafón). La fase estacionaria se presentó después de los 14 a 18 días ($2,12 \times 10^7$ cel mL⁻¹) (matraz) y de $1,09 \times 10^7$ cel mL⁻¹ después de los 38 días (garrafón).

La última fase de experimentación consistió en la estandarización de la metodología para evaluar el crecimiento de *C. vulgaris* y *C. protothecoides* a nivel masivo (garrafones de 20 litros), monitoreando sus cinéticas de crecimiento, parámetros fisicoquímicos y producción de biomasa. Finalmente, se evaluó el número de carbonos obtenidos en el aceite producido en los tres sistemas (carboy 1, 2 y 3) de *C. protothecoides*, mientras que para *C. vulgaris* solamente el carboy 2.

Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación se dan los fundamentos necesarios para el cultivo de microalgas, obtención de aceite y producción de biomasa con fines energéticos.

ABSTRACT

In the last four decades, the society has decided to reduce its dependence on oil and coal. This problem makes renewable energy to look with a heightened visibility in the future. Within this category is bioenergy, which is the conversion of biomass into fuels (biodiesel and bioethanol) for power generation. Nowadays the idea to use microalgae biomass creates expectations and confidence in a short-term to be considered the first economical way to produce biomass, collection of oils and biodiesel production because it costs less than conventional processes.

Initially it was evaluated the growth of the microalgae *Chlorella protothecoides* in different culture media, finding that the modified Bold Basal Medium is the most suitable for cultivation the microalgae. Subsequently it was evaluated the growth of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella protothecoides* at scaling level, starting from the purification of the strain, growth in test tube, Erlenmeyer Flasks with the capacities of 100, 500 y 1000 mL up to a 20 liter jug. Results for both species of microalgae showed good growth, with an increased in total solids (greater biomass productivity).

Chlorella protothecoides culture, began with a cell density of $1,00 \times 10^5$ cell mL⁻¹ (flask and jug). The growth showed a similar trend (flask and jug), with a lag phase, which ended on day 7 ($5,95 \times 10^5$ cell mL⁻¹) for flask and $1,42 \times 10^5$ cell mL⁻¹ in the day 3 for jug; the exponential phase lasted 29 days ($9,48 \times 10^6$ cell mL⁻¹) (flask) and de $1,10 \times 10^6$ cell mL⁻¹ of 16 days for jug. The stationary phase appeared after 30 days ($9,42 \times 10^6$ cell mL⁻¹) (flask) and of $2,80 \times 10^6$ cell mL⁻¹ from day 24 (jug).

For *Chlorella vulgaris* culture, initiated with a cell density of $5,00 \times 10^4$ cell mL⁻¹ for flask and $1,00 \times 10^5$ cell mL⁻¹ for jug. The growth showed a similar trend with a lag phase which ended on day 2 ($5,28 \times 10^5$ cell mL⁻¹) (flask) and $1,16 \times 10^5$ cell mL⁻¹ in day 4 (jug); The exponential phase lasted 13 days ($2,50 \times 10^7$ cell mL⁻¹) (flask) and $1,11 \times 10^7$ cell mL⁻¹ after 33 days (jug). The stationary phase occurred after 14 to 18 days ($2,12 \times 10^7$ cell mL⁻¹) (flask) and $1,09 \times 10^7$ cell mL⁻¹ after 38 days (jug).

Finally the last phase of experimentation consisted of the standardization of the methodology to assessing of the growth of the microalgae *C. vulgaris* and *C. protothecoides* at massive scale (jugs of 20 liters) through the monitoring of growth kinetics, physicochemical parameters and biomass production. Finally, was assessed the number of carbons obtained from the oil produced in the three systems (carboy 1, 2 and 3) of *C. protothecoides*, while for *C. vulgaris* only the carboy 2.

Therefore, in this research are given the necessary foundation for the cultivation of microalgae, oil extraction and production of biomass for energy purposes.

I. INTRODUCCIÓN

En este siglo la humanidad afronta una grave problemática debido al aumento de la demanda energética mundial, agotamiento de los combustibles fósiles, incremento del precio del petróleo y las dificultades ambientales causadas por los gases de efecto invernadero (contaminación del aire y calentamiento global). Esta situación demanda urgentemente fuentes alternas de energía basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente, que además posibiliten la captura de CO₂. Una alternativa energética promisoría que ha resultado muy atractiva en años recientes es el cultivo de microalgas para la obtención de biomasa, obtención de lípidos y producción de biodiesel (Garibay *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009).

El uso de microalgas para la producción de biomasa y producción de biodiesel es una alternativa ventajosa debido al elevado contenido de lípidos que acumulan, elevada eficiencia fotosintética, su capacidad de crecer tanto en aguas marinas, dulces, residuales y salobres, así como a su alta velocidad de crecimiento (Garibay *et al.*, 2009; Xiaoling *et al.*, 2006).

Los sistemas de cultivo de microalgas actualmente presentan ciertas limitantes tales como la escasez de información para su escalamiento, la dificultad para el mantenimiento de monocultivos, los elevados costos de operación para la producción y recolección de la biomasa producida (Garibay *et al.*, 2009).

I.1 Importancia de las microalgas para la obtención de lípidos y producción de biodiesel

En la actualidad se ha detectado el uso de lípidos microalgales para la producción de biodiesel, ya que es una alternativa que asegura satisfacer o reemplazar la demanda global de petrodiesel. Esta tecnología es prometedora dadas las ventajas que ofrece en contraste con las plantas oleaginosas, tales como: mayor eficiencia fotosintética, eficacia superior en la asimilación de nutrientes y periodos cortos de producción sostenida durante todo el año, a causa de los breves tiempos de duplicación de las microalgas.

Los cultivos microalgales son independientes de la estacionalidad inherente a los cultivos agrícolas y de la fertilidad del suelo, condición que posibilita prescindir de herbicidas y pesticidas y además, permite emplear territorios marginales e inclusive zonas no aptas para la agricultura, ganadería, industria y turismo.

Asimismo, en contraste con los cultivos tradicionales, requieren de menores cantidades de agua y son flexibles ante el tipo y la calidad de ésta (Garibay *et al.*, 2009), por lo que prosperan convenientemente tanto en aguas marinas, como dulces, salobres y residuales. Igualmente, el contenido oleaginoso y el perfil de

composición lipídica de las microalgas, puede ser controlado en función de las condiciones de cultivo, principalmente mediante la limitación de nutrientes.

Además, esta tecnología puede ser acoplada al reciclaje del CO₂ liberado en las emisiones industriales, especialmente por las plantas de producción de electricidad a partir de combustibles fósiles. Una ventaja adicional estriba en la posibilidad de obtener subproductos (proteína, carbohidratos, biopolímeros, pigmentos, biogás, etc.) a partir de la biomasa microalgal residual una vez que los lípidos han sido extraídos. Inclusive, resulta factible el empleo de algunos de estos residuos en la alimentación humana o animal y en la producción de fertilizantes o de otros biocombustibles.

Finalmente, la ventaja competitiva más importante del biodiesel de microalgas, consiste en los rendimientos lipídicos por unidad de área considerablemente superiores a los obtenidos con plantas oleaginosas (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan *et al.*, 1998; Chisti, 2007; Li *et al.*, 2007; Williams, 2007; Dismukes *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Rittmann, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Gouveia & Oliveira, 2009; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009; Waltz, 2009).

La tecnología de microalgas es una alternativa prometedora, ya que para satisfacer el 100% de la demanda actual de diesel de petróleo en México, sería necesario emplear sólo 1% de la extensión total del país, al considerar el rendimiento lipídico y la independencia a la calidad de los suelos por parte de los cultivos de microalgas (Schenk *et al.*, 2008; CIA World Factbook, 2009).

I.2 Problemática

Debido a la condición actual de agotamiento de los combustibles fósiles, incremento de los precios del petróleo y calentamiento global como consecuencia de la acumulación de gases de invernadero, el panorama para la producción de bioenergía a partir de microalgas es alentador (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan *et al.*, 1998; Huntley & Redalje, 2007; Hu *et al.*, 2008; Rodolfi *et al.*, 2009; Waltz, 2009).

Las microalgas con elevadas productividades lipídicas son deseables para la elaboración de biodiesel, razón por la cual la cantidad de lípidos contenidos en la biomasa y la velocidad de crecimiento, sumados a la eficiencia metabólica y la robustez del microorganismo, son parámetros relevantes para su selección (Chisti, 2007; Rosenberg *et al.*, 2008).

I.3 Propuesta de solución

Desde la antigüedad las microalgas se han usado como alimento humano, sin embargo, es hasta ahora que han atraído la atención para la investigación de su potencial biotecnológico. El interés por las microalgas surgió en Alemania en los años cincuenta y sesenta al ser consideradas como una fuente abundante de proteína de bajo costo para la nutrición humana, interés que después se extendió a países de todos los continentes. El atractivo de las microalgas posteriormente fue encauzado hacia otras aplicaciones tales como la acuicultura (cultivo de especies acuáticas vegetales y animales en medios naturales y artificiales), el tratamiento de aguas residuales, la obtención de sustancias químicas finas, la producción de farmacéuticos y los procesos de bioconversión energética.

La producción de bioenergía a partir de microalgas fue contemplada desde los años cincuenta, sin embargo a partir de la crisis energética de 1975, el potencial económico de esta tecnología fue reconocido por varios países como EUA, Japón y Australia (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Huntley & Redalje, 2007).

Asimismo, la obtención de biodiesel a partir de plantas oleaginosas (comestibles y no comestibles) está limitada por varios inconvenientes tales como los largos periodos de producción (meses o años) inherentes a la tecnología agrícola, el rendimiento lipídico restringido (menor al 5% del peso seco total) y la dependencia a las condiciones climáticas, la ubicación geográfica, la fertilidad de los suelos y la variedad cultivada; no obstante, el principal obstáculo es la extensa superficie de cultivo requerida y el enorme volumen de agua necesario para el riego (Li *et al.*, 2007; Chisti, 2007; Chisti, 2008; Schenk *et al.*, 2008). La sustentabilidad de la industria del biodiesel requiere de materias primas alternas que permitan operar continuamente y superar las limitaciones señaladas (Liu & Zhao, 2007); una alternativa prometedora es la obtención de aceites a partir de cultivos de microalgas.

Las investigaciones concernientes al cultivo de microalgas no han tenido gran alcance, por eso se hace necesaria la realización de este estudio más elaborado para obtener de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*, información que nos permita conocer su comportamiento de crecimiento a nivel de escalamiento y nivel masivo para la producción de biomasa y obtención de aceites. A continuación dada la importancia de este trabajo de investigación, se plantea el siguiente objetivo general y los objetivos específicos para cada una de las fases de experimentación.

El objetivo general de este trabajo de tesis fue evaluar el crecimiento de dos microalgas, a través de sus curvas de crecimiento, con el fin de determinar las mejores condiciones de cultivo, así como su potencial para la producción de lípidos.

Los objetivos específicos de las presentes fases experimentales son los siguientes:

Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella protothecoides* en diferentes medios de cultivo (Fase experimental I).

Evaluar el crecimiento de *Chlorella protothecoides* en diferentes medios de cultivo, con el propósito de encontrar y seleccionar el mejor medio de crecimiento de la microalga bajo estudio.

Evaluar las mejores condiciones de cultivo para el crecimiento (cinética) de la microalga *Chlorella protothecoides* bajo condiciones de laboratorio.

Evaluación del crecimiento de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* a nivel escalamiento para la producción de biomasa (Fase experimental II).

Evaluar el crecimiento (cinéticas) de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* a nivel de escalamiento, bajo condiciones de laboratorio y autotróficas.

Encontrar las mejores condiciones de cultivo para el crecimiento de las microalgas bajo estudio con el objetivo de producir una mayor cantidad de biomasa.

Estandarización del método de cultivo de microalgas para dos especies *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* a nivel masivo para la producción de biomasa y obtención de aceites (Fase experimental III).

Estandarizar el método de cultivo de microalgas para dos especies *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* bajo condiciones de laboratorio.

Evaluar el crecimiento de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* a nivel masivo para la producción de biomasa y obtención de aceites.

Extraer de la biomasa obtenida, los aceites mediante una destilación tipo Soxhlet, utilizando como solvente hexano.

Extraer mediante una destilación simple con rotaevaporador los aceites de cada una de las especies de microalgas bajo estudio.

Determinar los ácidos grasos (átomos de carbono) presentes en las muestras de aceite a través de un cromatógrafo de gases.

Los sistemas de cultivo de microalgas actualmente presentan ciertas limitantes tales como: la escasez de información para su escalamiento, la dificultad para el mantenimiento de monocultivos, los elevados costos de operación para la producción y recolección de la biomasa. Por lo tanto, en este proyecto de investigación, uno de los propósitos es proporcionar un panorama general y crítico de esta alternativa bioenergética. Por lo que a continuación se describirá brevemente la estructura de este proyecto de investigación, el cual está organizado en cinco capítulos, capítulo I abarca la introducción, en la cual se plantea de manera general la importancia de las microalgas para la obtención de lípidos y producción de biodiesel, la problemática y la propuesta de solución.

El capítulo II comprende de manera general las principales características de la energía renovables (fuentes alternas de energía) y la producción de microalgas como materia prima. En el capítulo III, se da un panorama general de las barreras que existen en el desarrollo de las energías renovables en México, la perspectiva de las energías renovables, es decir una visión hacia el 2030 en México y sobre la perspectiva a futuro de la producción de biomasa a través del cultivo de microalgas.

En el capítulo IV, dada la importancia del cultivo de las microalgas y al tomar en consideración el interés actual en nuestro país por el desarrollo de nuevas fuentes alternas de energía renovable, se describe de manera general la estrategia de trabajo que se llevo a cabo durante el desarrollo de este trabajo de investigación, dividiéndose en tres fases experimentales.

La primera de ellas consistente en la evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella protothecoides* en diferentes medios de cultivo. En términos generales la primera fase experimental comprende evaluar diferentes medios de cultivo con el propósito de encontrar, cuál de los medios probados, es el más adecuado para el crecimiento de la microalga bajo estudio. Los medios de cultivos probados serán: Medio Basal de Bold (MBB), Medio Basal de Bold modificado, medio Watanabe a pH=6 y pH=8, medio Watanabe bajo en nitrógeno, medio Basal de Bold y Watanabe con 10 y 20 gL⁻¹ de glucosa.

En la segunda fase experimental se plantea evaluar el crecimiento de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* a nivel de escalamiento para la producción de biomasa y bajo condiciones de laboratorio. En esta fase se iniciará desde la purificación de la cepa, crecimiento en tubo de ensayo, matraz Erlenmeyer de 100, 500 y 1000 mL hasta un garrafón de 20 litros de capacidad (carboy) para la producción masiva de biomasa.

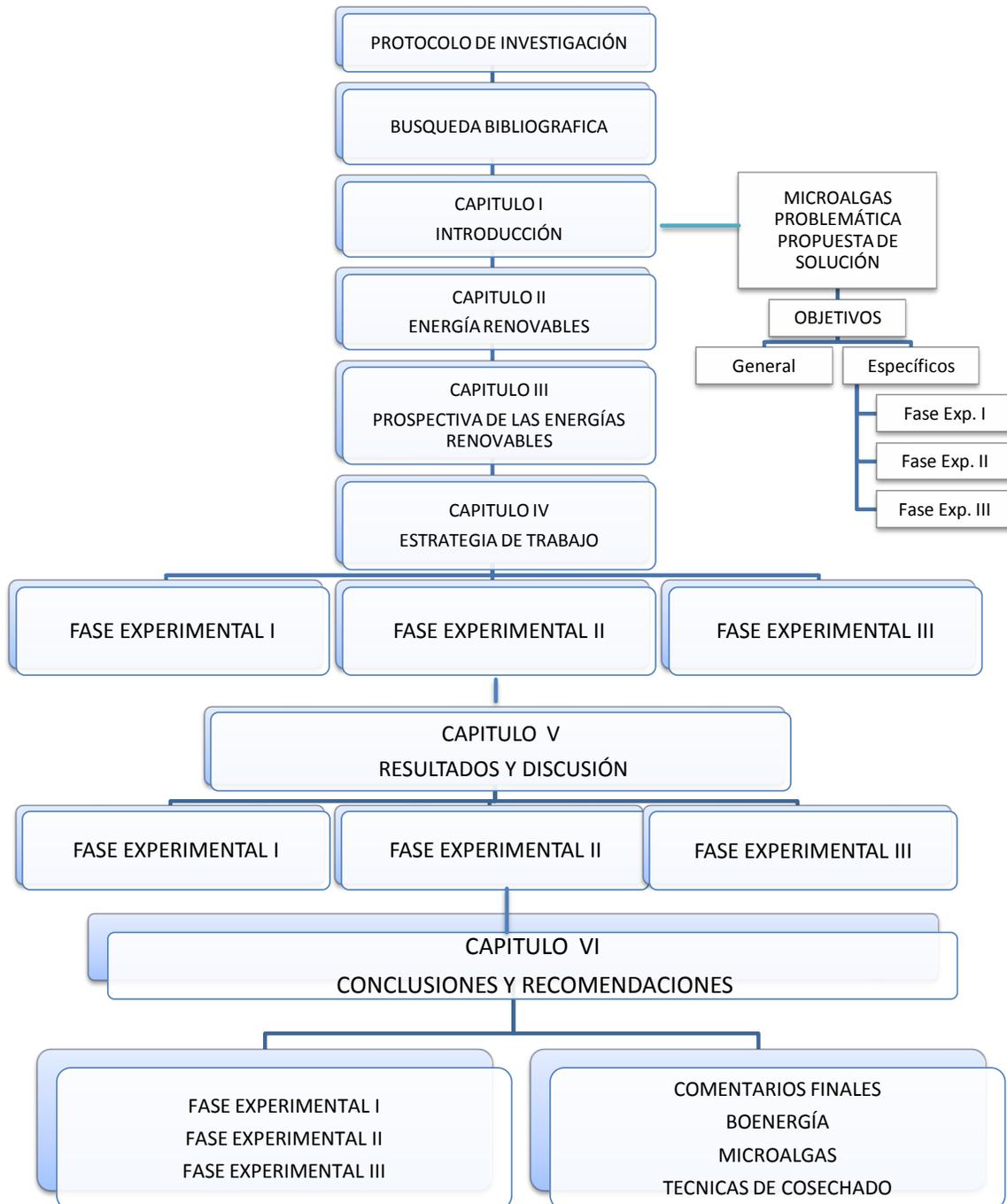
En la tercera fase experimental, se estandarizó la metodología para evaluar el crecimiento de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* a nivel masivo para la producción de biomasa (utilizando garrafrones de 20 litros de capacidad) y obtención de aceites, monitoreando durante la fase experimental sus cinéticas de crecimiento, parámetros fisicoquímicos y producción de biomasa.

La extracción de los aceites de la biomasa producida, se llevará a cabo mediante una destilación simple a través de un sistema Soxhlet y de una evaporación del solvente por medio de un rotoevaporador.

En el capítulo V, se presentan los resultados obtenidos y la discusión de los mismos en base a comparación entre las diferentes fases experimentales y de los recabados bibliográficamente. Finalmente en el capítulo VI se mencionan las conclusiones a las que se llegó durante todo este trabajo de investigación así como las recomendaciones que se proponen para llevar a cabo un adecuado cultivo de microalgas para la producción de biomasa y obtención de aceites.

Por lo anterior, en el siguiente Diagrama de Flujo se muestra de manera resumida la estrategia general de trabajo realizada durante todo el trabajo de investigación.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



II. MARCO TEÓRICO

II.1 ENERGÍA RENOVABLES

II.1.1 Fuentes de energía

La matriz energética mundial depende en gran medida de los combustibles fósiles, datos de la World Energy indican que más del 80% del consumo de la energía primaria mundial se basa en energías no renovables y se espera que las necesidades de energía aumenten en forma sostenida en los próximos años. Se estima que para el 2030 haya un aumento del 50% en la demanda de energía con respecto a la actual. El 65% de este aumento en la demanda energética esperada, provendrá de los países en desarrollo en donde el crecimiento económico y de la población es mayor. Asimismo, la incertidumbre por la variación en el precio del petróleo, hace que muchos países dependientes de la importación de este recurso estén preocupados por la seguridad en la oferta futura y buscan sustituir la fuerte dependencia de hidrocarburos por recursos renovables y económicamente viables (González-Longatt, 2007; León, 2010).

En el contexto energético actual, los beneficios económicos de las energías renovables (fuentes alternas de energía) han adquirido creciente relevancia, pues contribuyen a reducir los riesgos asociados con la volatilidad de precios, diversificando el portafolio energético, reduciendo el impacto ambiental y impulsando el desarrollo sustentable del país (Torres & Gómez, 2006).

La Secretaría de Energía (SENER) ha buscado el desarrollo y difusión de tecnologías energéticas alternativas, por lo que se han dedicado esfuerzos a la creación de políticas energéticas con el criterio de sustentabilidad, desarrollando instrumentos y mecanismos financieros para fortalecer el marco regulatorio, con el fin de eliminar barreras y abrir ventanas de oportunidades para nuevos proyectos.

La Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión aprobó el 28 de Noviembre de 2008 la nueva Ley para el Aprovechamiento de las Fuentes Renovables de Energía. Esta iniciativa de Ley prevé entre otros instrumentos, la creación de un fideicomiso que permitirá que las fuentes de energía renovable alcancen en el 2012, un 8 % en la participación de la generación de electricidad nacional. Con esta Ley, México se unirá al grupo de países, que cuentan con políticas públicas para fomentar el desarrollo de tecnologías para el aprovechamiento de las fuentes renovables de energía (Torres & Gómez, 2006).

Por lo anteriormente descrito, la Secretaría de Energía (SENER) asume un papel primordial en la aplicación de dicha Ley como: rector de la política, la planeación energética del país, coordinará, integrará y promoverá las políticas y programas energéticos en fomento de estas fuentes alternas de energía. La implementación de estas medidas, permitirá avanzar en los compromisos que México ha adquirido

en el contexto de la Convención Marco de las Naciones Unidas para el Cambio Climático (CMNUCC), su Protocolo de Kioto y en marco de la Conferencia Internacional de Energías Renovables de Bonn 2004.

El Programa Sectorial de Energía 2001-2006 (PSE) propuso establecer acciones necesarias para que, tanto el sector público y privado, participen en nuevos proyectos con energías renovables, incluyendo las tecnologías solar, eólica, geotérmica, minihidráulica, biomasa y biogás, entre otras. Además se establecen los principios rectores de la Política Energética: soberanía energética, seguridad de abasto, compromiso social, modernización del sector, mayor participación privada, orientación al desarrollo sustentable y el compromiso con las futuras generaciones, por lo que, las fuentes de energía que se renuevan constantemente, juegan un papel primordial (Torres & Gómez, 2006).

Las Energías Renovables (ER) son una respuesta a la demanda generalizada de un modelo sustentable de progreso que no afecte a las generaciones futuras. El aprovechamiento eficaz contribuirá a la conservación y uso eficiente de los recursos energéticos no renovables. Las economías de escala alcanzadas como resultado del aprovechamiento de las mismas junto con el incremento en los precios de los combustibles fósiles han mejorado su posición competitiva, abriéndoles mayores posibilidades.

En México, el potencial de las Energías Renovables (ER) durante el periodo de 1993 al 2003, estuvieron representados por los hidrocarburos ya que tuvieron la mayor participación en la oferta interna bruta de energía primaria, mientras que la contribución de las energías renovables fue baja, utilizándose principalmente para calefacción y para la generación de electricidad. Se espera que para el 2014, haya un incremento importante de las energías renovables, impulsados por la SENER y Comisión Federal de Electricidad (CFE), en materia de hidroelectricidad (2,254 MW), eoloelectricidad (592 MW) y geotermia (125 MW).

Por lo anterior, México posee una escasa diversificación de la oferta energética. El 90% de la energía primaria proviene de los hidrocarburos (9 553.762 Pj), principalmente del petróleo crudo; el resto lo aportan la electricidad primaria (4.6%), la biomasa (3.2%) y el carbón (2.2%). De acuerdo a estos porcentajes, es evidente que México necesita diversificar las fuentes primarias de energía para obtener energías renovables que favorezcan el desarrollo tecnológico y económico del país (León, 2010).

Estas fuentes primarias o fuentes alternas de energía, se pueden llevar acabo aprovechando el gran potencial que tenemos para la generación de energía a partir de fuentes importantes como: la solar, la eólica, la geotérmica, la minihidráulica, la mareomotriz, la hidroeléctrica, nuclear y la biomasa. Además debería de existir más inversiones y esfuerzos para la expansión de producción y uso de estas fuentes alternas de energía, disminuyendo el uso de combustibles

fósiles, causantes principalmente de la contaminación atmosférica y del calentamiento global de la tierra (Torres & Gómez, 2006; Schvarzer & Tavošnanska, 2007).

Otra razón que lleva a promover el uso de energías renovables y limpias, es la creciente preocupación y compromiso por preservar el medio ambiente. Algunos países han lanzado programas para la producción y/o uso de biocombustibles con miras para abastecer la energía que consumen, volcar sus mercados internos o con planes a la exportación, tal es el caso de Brasil y Estados Unidos de Norteamérica que producen el 70% del bioetanol del mundo. Además países como Canadá, Colombia, Perú y Argentina también han lanzado programas con el objetivo de diversificar su matriz energética (León, 2010).

Por lo anterior, a continuación se da una breve introducción de cada una de las fuentes de energía, las cuales presentan un gran potencial para la generación de energía.

II.1.1.1 Energía solar

Es la energía irradiada por el sol, en forma de calor, luz, radiaciones infrarrojas, radiaciones ultravioleta y rayos X. La energía del sol puede utilizarse directamente para el calentamiento o puede convertirse en electricidad mediante celdas fotovoltaicas (IPN, 2007; Machado, 2010).

El aprovechamiento de la energía solar, se realiza principalmente mediante la utilización de dos tipos de tecnologías:

- **Fotovoltaicas:** Convierten la energía solar en energía eléctrica con celdas fotoeléctricas (hechas de silicio y que reaccionan con la luz). Los sistemas fotovoltaicos son actualmente viables para sitios alejados de las redes eléctricas y aplicables en electrificación y telefonía rural, bombeo de agua y protección catódica.
- **Termosolares:** Usan la energía del sol para el calentamiento de fluidos mediante colectores solares, alcanzando temperaturas de 40 a 100 °C (planos) o concentradores, obteniéndose temperaturas de hasta 500 °C (Torres & Gómez, 2006).

Soto (2008), describe que existen dos tipos de tecnologías: la que se produce usando celdas solares para generar electricidad, y la energía térmica, que aprovecha el calor proveniente del sol para actividades tan variadas como calentar agua para diversos usos, preparar alimentos mediante cocinas solares, hasta fundir metales, como sucede en Francia y otros países. Para explotarla de esta manera se concentra energía en un punto específico por medio de grandes espejos parabólicos, lográndose muy altas temperaturas. Aunque es una

tecnología muy limpia, pues no contamina, todavía es muy costoso invertir en ella; por ahora es inviable abastecer a una ciudad sólo con energía solar.

Dentro de los materiales fotónicos se encuentran las celdas solares, otra alternativa ecológica en boga en los últimos tiempos, debió a que su fuente de energía es la radiación solar, es decir, no depende de los recursos no renovables como el carbón, petróleo o gas natural.

Existen ya diversos sistemas para aprovechar la energía, como las celdas solares fotovoltaicas, los calentadores solares, los sistemas de almacenamiento térmico-solares o la celda fotoelectroquímicamente. La búsqueda de materiales mejorados, orientados a innovar la tecnología, es la base fundamental para la creación de nuevas fuentes alternas de energía (Soto, 2008).

II.1.1.2 Energía eólica

Es el aprovechamiento de vientos intensos para producir fuerza motriz, generando electricidad. Las turbinas de viento son máquinas con hélices propulsoras que convierten la energía del viento en energía eléctrica (IPN, 2007).

Machado (2010), define la energía eólica como: la conversión de la energía de los vientos en electricidad utilizando turbinas. Es una energía abundante, renovable, ampliamente distribuida, no emite compuestos tóxicos a la atmósfera y reduce las emisiones de gases con efecto invernadero. Al parecer esta tecnología está a punto de volverse económicamente viable para competir con las fuentes tradicionales de generación de electricidad, además de existir un gran potencial eólico a ser explotado en diversos países.

El aprovechamiento de la fuerza del viento es un recurso muy poco explotado por empresas mexicanas, y quienes lo llevan a cabo para beneficio propio son principalmente compañías españolas. Esta energía está ligada a la actividad solar que origina sobre el planeta diferencias de presión atmosférica y de temperatura. Las corrientes horizontales de aire actúan permanentemente sobre el globo con flujos verticales del aire debidos a la evaporación de superficies marítimas extensas. La dirección del viento está también influida en cierta medida por la rotación de la tierra, a través de las fuerzas de Coriolis. No se puede disponer de la energía eólica producida por dichas corrientes de aire más que con intensidades variables que van desde la calma hasta las condiciones extremas del huracán.

II.1.1.3 Energía geotérmica

Es la energía en forma de calor que se produce en el interior de la tierra, liberándose en erupciones volcánicas. El calor del magma terrestre actúa sobre los mantos acuíferos subterráneos y al elevarse la temperatura del agua se eleva su presión y escapa hacia la superficie (géiseres) (IPN, 2007).

Los recursos de alta temperatura ($T > 200^{\circ}\text{C}$) pueden utilizarse para generar energía eléctrica, los de temperatura baja ($T < 200^{\circ}\text{C}$) para aplicaciones térmicas. México ocupa el tercer lugar mundial en capacidad de generación de energía geotérmica con 960 MW instalados, generando más de 6,500 GWh/año (Torres & Gómez, 2006).

Su utilización tanto para electricidad como para calor es atrayente considerando el potencial: 1% de la energía térmica contenida en una camada superficial de 10 km de la tierra corresponde a 500 veces todas las reservas de aceite y gas (Machado, 2010).

El nuestro es un país volcánico por excelencia y esta fuente ha sido relativamente poco aprovechada, pese a que México ocupa el cuarto lugar en producción a nivel mundial, detrás de Filipinas, Indonesia y Estados Unidos. En el campo geotérmico de Cerro Prieto, en Baja California, se instaló hace más de 30 años una planta generadora de electricidad, en la cual el vapor seco que proviene del subsuelo es dirigido a turbinas que generan la energía eléctrica; otras plantas en funcionamiento están en Los Azufres, Michoacán, de mediana producción. Pero hay unos 30 sitios en el país con potencial de ser explotados a lo largo del cinturón volcánico mexicano. La energía geotérmica representa aproximadamente el 4% del total de la producción eléctrica en México.

II.1.1.4 Energía hidráulica

Las centrales mini-hidráulicas (<5 MW) se clasifican, según la caída de agua que aprovechan, en función del embalse y del tipo de turbina que utilizan en (Torres & Gómez, 2006):

- Baja carga (caída de 5 a 20m).
- Media carga (caída de 20 a 100m).
- Alta carga (caída mayor a 100m).

II.1.1.5 Energía mareomotriz

Es la captación de la energía contenida en el desplazamiento de las mareas y corrientes oceánicas, obteniéndose dos tipos de energía: energía cinética de las corrientes y energía potencial.

Otro concepto sobre la energía mareomotriz es: Energía que puede recuperarse en forma útil, explotando la energía debida al desplazamiento vertical de masa de agua a partir de su nivel medio o la energía debida a las corrientes de marea, flujo y contraflujo. Aquí cabe hacer referencia a los molinos submarinos, instalación que utiliza ruedas o hélices diseñadas para aprovechar la energía de las corrientes oceánicas submarinas transformándolas en energía útil.

Su construcción y operación son complejas (ingeniería hidráulica). Se construye un barraje, formándose un reservorio junto al mar. Cuando la marea es alta, el agua llena el reservorio y pasa a través de una turbina hidráulica, produciendo energía eléctrica, mientras que cuando la marea es baja, el reservorio es vaciado y el agua que sale del reservorio pasa nuevamente a través de la turbina (sentido contrario) produciendo la energía eléctrica.

Las primeras instalaciones en el mundo surgieron en el año 2001. Hay un enorme interés en su desarrollo tecnológico, con cerca de 1000 patentes requeridas. Actualmente es aplicada para la generación de electricidad en algunos países, tales como Francia, Japón e Inglaterra (Machado, 2010).

II.1.1.6 Energía hidroeléctrica

Es la energía proveniente de grandes caídas de agua, captándose en turbinas que la transforman en energía eléctrica en plantas hidroeléctricas. La expansión de este tipo de energía no contaminante está limitada por la escasez de ríos caudalosos, en tanto que la instalación de mini y micro hidráulicas depende de la capacidad potencial de su operación (IPN, 2007). Además de que el territorio nacional es por lo general árido o semiárido y carece de grandes ríos navegables, lo cual da como resultado que en un futuro el crecimiento de la generación hidroeléctrica sea limitado (Abalde & Herrero, 2004).

La Secretaría de Energía ha pensado en recurrir a la energía minihidráulica, es decir, a la fuerza del agua en canales de riego y pequeñas represas. En los canales se ha estimado un potencial aprovechable de 300 MW o más.

II.1.1.7 Energía nuclear

Es la producción de electricidad a partir del uranio, en algunos países los porcentajes de producción son pequeños por diversas razones, entre ellas, porque instalar una planta requiere de fuertes inversiones iniciales, sobre todo por los complejos sistemas de seguridad que deben incorporarse cuyos costos no parecen disminuir; además, existe una fuerte oposición de los grupos ambientalistas, tanto por el riesgo de accidentes como por el problema de disponer de los residuos radiactivos.

En México desde hace 17 años funciona la planta nuclear “Laguna Verde”, con una producción de 1,365 megawatts. Actualmente el Gobierno de la República se propone ampliar la producción de la planta en un 20% y construir una nueva central nuclear eléctrica (IPN, 2007).

II.1.1.8 Energía de biomasa

En la actualidad, el término biomasa se denomina al grupo de productos energéticos y materias-primas originados a partir de la materia orgánica formada por vía biológica y que pueden ser procesados para proveer formas bioenergéticas más elaboradas y adecuadas para el consumo final.

La energía de biomasa, es la energía acumulada en la madera, carbón de leña, bagazo de caña, basura y desechos urbanos de tipo orgánico, que al quemarse producen energía calorífica y eventualmente se puede transformar en energía eléctrica (IPN, 2007).

Algunos ejemplos de la energía de la biomasa son: el carbón vegetal, el biogás (resultado de la descomposición anaerobia de desechos orgánicos y otros residuos agropecuarios), biocombustibles líquidos (etanol y biodiesel), la bioelectricidad (generada por la quema de combustibles como: el bagazo y la leña) (Machado, 2010).

Las pruebas de producción de biomasa con microalgas son generalmente sensibles, rápidas y económicas sobre todo si se utilizan en pruebas a pequeña escala, por ello son frecuentemente usadas en estudios ambientales y son aplicadas en un número diferente de contextos (Eisentraeger *et al.*, 2003).

A continuación, se ampliará el concepto de bioenergía debido a que el tema principal de este trabajo de investigación es el cultivo de microalgas para la producción de biomasa, como fuente de energía.

II.1.2 Bioenergía

Se ha optado por el uso y la explotación de fuentes de energía renovables como: el viento, el sol, las olas, geotermia y biomasa. De estos, se desprende el término bioenergía; es decir, la obtención de biogás o biocarburantes que pueden utilizarse para producir electricidad, gasolina u otros biocombustibles (Cerutti, 2006).

Otra manera de definir la bioenergía es: la manera de generar energía a partir de biomasa (materia viva o derivada de seres vivos), esta depende principalmente del tipo de biomasa que se esté tratando y del destino que se quiera dar a esa energía (Cerutti, 2006; Gómez, 2007).

Estrada e Islas (2010), definen la bioenergía como la energía que se obtiene de la biomasa y esta puede contribuir a las estrategias de desarrollo sustentable del país.

La bioenergía incluye un rango amplio de productos, que se han dividido en tres tipos de biocombustibles (Cerutti, 2006; Gómez, 2007; Chum *et al.*, 2011):

- Biocombustibles sólidos: Leña, carbón, residuos agrícolas y pecuarios y residuos municipales, que se gasifican para producir calor y electricidad.
- Biocombustibles líquidos: En el cual se utilizan cultivos energéticos (caña de azúcar, oleaginosas, higuera, palma de aceite y coco) para generar etanol y biodiesel
- Biocombustibles gaseosos: Obtenidos de los residuos municipales y estiércol (biogás y metano).

II.1.2.1 Características de la bioenergía

Las características más importantes de la bioenergía son (Cerutti *et al.*, 2011).

- **Almacenable:** La energía de la biomasa está almacenada en la materia orgánica para la generación de calor o electricidad.
- **Permite satisfacer la mayor parte de los usos finales:** Es la energía renovable que puede sustituir a los combustibles fósiles en todas las aplicaciones y finalidades, produciendo calor, fuerza motriz, electricidad y biocarburantes líquidos.
- **Ubicua:** La biomasa se puede encontrar o cultivar en casi todas las partes, está disponible en forma concentrada como subproducto de procesos agroindustriales, residuos de actividades humanas y como estiércol de animales.
- **Escalable:** Existen sistemas de aprovechamiento de biomasa y producción de bioenergía desde muy bajas (< 1 kW) hasta grandes potencias (> 300,000 kW), permitiendo una amplia versatilidad para el desarrollo de sistemas de suministro energético a escalas locales y mayores.
- **Comercialmente madura:** Muchas de las tecnologías para el uso energético de biomasa son rentables y están ampliamente desarrolladas a nivel comercial.

II.1.2.2 Usos de la bioenergía

Leña: Combustible, materia prima para biogás y alcoholes.

Alcoholes y Biodiesel: Combustible para motores de combustión.

Biogás: Combustible, generación eléctrica y cogeneración.

El Fondo de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2001) agrupa a los biocombustibles o bioenergéticos en tres categorías:

- 1) Combustibles de madera.
- 2) Agrocombustibles.
- 3) Subproductos de origen municipal.

En el caso de México se han clasificado siete subcategorías (DOF, 2008):

- 1) Combustibles de madera (bosques naturales y plantaciones).
- 2) Subproductos de la extracción forestal e industria maderera.
- 3) Subproductos agrícolas.
- 4) Subproductos pecuarios.
- 5) Subproductos agroindustriales.
- 6) Cultivos energéticos.
- 7) Subproductos de origen municipal.

Actualmente, la bioenergía representa el 8% del consumo de energía primaria en México. Los principales bioenergéticos empleados son el bagazo de caña (para generación eléctrica y/o térmica en la industria azucarero) y la leña (usada para calefacción y cocción de alimentos).

El uso de las microalgas para la producción de energía fue propuesto por primera vez hace más de 50 años, con la producción de gas metano. Pero fue en la década de 1970, con la crisis del petróleo y consecuente aumento del costo de los combustibles convencionales, que el uso de microalgas como materia prima para biocombustibles paso a recibir mayor atención por varios países como Estados Unidos y Japón donde fueron creados programas de investigación en el tema, financiados por el gobierno (Machado, 2010).

El programa norteamericano sobre bioenergía existió entre los años 1978 a 1996 y tuvo como principales áreas de actuación el aislamiento, caracterización, fisiología, bioquímica e ingeniería genética de especies de microalgas para la producción de biodiesel, así como también el cambio de escala de producción y análisis económico de los procesos. Se concluyó que el uso de microalgas para la producción de biocombustibles a precio competitivo era técnicamente viable, pero todavía sería necesario gran inversión en investigación para que se alcanzara una alta productividad requerida (Sheehan *et al.*, 1998; Machado, 2010).

El programa japonés (1990-2000) fue dirigido al estudio de la fijación de CO₂ y a la optimización del crecimiento de microalgas. Ambos programas fueron suspendidos por cortes de gastos gubernamentales y aparente inviabilidad económica de las tecnologías ante el precio del petróleo en la época (Hernández *et al.*, 2009).

La *fiebre* por los biocombustibles no es nueva: países como Brasil, Estados Unidos, Alemania, Austria, Canadá, Francia, Italia, Malasia y Suecia son pioneros en la producción, ensayo y uso de biodiesel en automóviles. Algunos de estos países iniciaron sus investigaciones desde hace 10 o 15 años y actualmente rigen el mercado de los biocombustibles (DOF, 2008).

En el 2007, Brasil, India, Sudáfrica, China, Estados Unidos y la Unión Europea crearon el Foro Internacional de Biocombustibles, con el fin de ser un mecanismo de diálogo entre los grandes productores y consumidores de biocombustibles. Países como Australia, Canadá, China, Colombia, Ecuador, India, Indonesia, Malawi, México, Mozambique, Filipinas, Senegal, Sudáfrica, Tailandia y Zambia, ya han promulgado políticas para producir bioenergía.

Para el caso de México, el interés e investigación por los biocombustibles ya tiene algunos años y lo han realizado instituciones como: Instituto de Investigaciones Eléctricas (IIE) que ha realizado estudios sobre generación de biomasa y procesos de gasificación; la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que trabaja en estudios de biomasa, hidrógeno y gasificación; la Universidad Veracruzana, que analiza la producción de bioetanol y el Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY) que estudia la producción de hidrógeno. A pesar de esto, hace sólo unos cuantos años que se considera la producción de biocombustibles a nivel comercial (DOF, 2008).

México ya promulgó la *Ley de promoción y desarrollo de los bioenergéticos*, en el cual propone estrategias en favor de la producción, comercialización y utilización de biocombustibles (DOF, 2008).

Finalmente, la generación de bioenergía permite la diversificación energética y puede ser un vehículo de transición hacia el uso de la energía renovable (González, 2009).

Como conclusión, las reservas de energías fósiles, como el carbón, gas natural y petróleo, están disminuyendo y la demanda hacia energías renovables presenta un gran crecimiento. La “bioenergía” obtenida a partir de biomasa es una de ellas, incluso se podría decir que es la más importante ya que se dice que es la que presenta mayor potencial técnico para el desarrollo de energías renovables y suministrar en un futuro una gran parte de la fuente energética.

A continuación, en el siguiente punto se hablará sobre biomasa debido a que en este trabajo investigación, el tema principal es el cultivo de microalgas para la producción de biomasa y posterior obtención de aceites.

II.1.3 Biomasa

Durante el transcurso de la historia de la humanidad hasta la revolución industrial, la biomasa ha servido como una fuente de energía para cubrir las necesidades de calor e iluminación en la vida cotidiana así como para distintas industrias (Chum *et al.*, 2011).

Anteriormente la biomasa era utilizada para cocinar, calentar, cocer cerámica, producir metales y para mover máquinas de vapor. Progresivamente estas máquinas fueron requiriendo una mayor cantidad de energía, por lo cual utilizaron ahora como fuente de energía, el carbón, a mediados del siglo XVIII. Desde entonces se empezaron a utilizar fuentes energéticas con un mayor poder calorífico y el uso de la biomasa declinó. Actualmente, según datos del Fondo de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), algunos países pobres obtienen el 90% de su energía de la leña y otros biocombustibles (FAO, 2001, Chum *et al.*, 2011).

Estrada e Islas (2010), definen la biomasa como toda materia viva o derivada de seres vivos que incluye un rango amplio de materiales como: madera, frutos, granos, jugos o fibras. Estos pueden ser obtenidos de cultivos y residuos sólidos o líquidos, entre otras fuentes. A partir de ellos se puede extraer energía útil directamente o después de transformarlos en carbón, sintegás, biogás, bioetanol o biodiesel

II.1.3.1 Tipos de Biomasa (Bioplat, 2006):

- Biomasa natural: Se produce de forma espontánea en la naturaleza, sin intervención humana (podas naturales de los bosques).
- Biomasa residual seca: Procede de recursos generados de las actividades agrícolas, forestales, industrias agroalimentaria y maderera (aserrín).
- Biomasa residual húmeda: Procede de vertidos biodegradables formados por aguas residuales urbanas e industriales y residuos ganaderos.

Cultivos energéticos: Biomasa que pueda ser transformada en biocombustible, incluye los cereales, oleaginosas, remolacha y cultivos lignocelulósicos y microalgas.

II.1.3.2 Usos energéticos de la biomasa (Probst, 2006).

La biomasa se presenta en los tres estados de la materia:

- Sólido: Leña y bagazo.
- Líquido: Alcoholes (etanol y metanol) y Biodiesel.
- Gaseoso: Biogás y materia sólida gasificada.

La tecnología aplicada a la biomasa está teniendo un gran desarrollo y se concentra en incrementar el rendimiento energético y la productividad de este recurso. La utilización de la biomasa como fuente de energía puede contribuir a sustituir la utilización de los combustibles fósiles, lo que daría mayor seguridad energética nacional con una diversificación más amplia de las **fuentes de energía**.

Las tecnologías bioenergéticas se están desarrollando actualmente a una velocidad sin precedentes, debido a las políticas mundiales para mitigar el cambio climático, los precios crecientes del petróleo y la inseguridad del abasto de energéticos fósiles. Por lo tanto, la biomasa al ser una fuente de energía renovable puede ayudar a mitigar cambios, siempre y cuando se produzca de manera sostenible (Estrada e Islas, 2010).

II.1.3.3 Tipos de aceites

El biodiesel se obtiene a partir de grasas de origen vegetal, entre las principales materias primas para la obtención de aceites y su posterior producción son (Monthieu, 2010):

Aceites vegetales convencionales: Provenientes de aceites de semillas oleaginosas como el girasol, la colza y la soja.

Aceites vegetales alternativos: En varios países se están realizando estudios con el propósito de encontrar cultivos nuevos y específicos que puedan adaptarse mejor a las condiciones del suelo y que presenten mejores propiedades.

Aceites vegetales modificados genéticamente: Los aceites con proporciones altas de ácidos grasos insaturados disminuyen su estabilidad a la oxidación, ocasionando un mayor índice de yodo, estos pueden ser modificados genéticamente con el propósito de reducir la proporción de los mismos. Un ejemplo es el aceite de girasol de alto contenido oleico.

Aceites de fritura usados: Constituye la materia prima más barata y se evitan costos de tratamiento como residuo. Este aceite suele contener un alto porcentaje de impurezas y humedad, por lo que es necesario un pretratamiento para poder limpiarlo. Esta limpieza requiere de altos niveles energéticos, ya que se emplean elevadas temperaturas, decantación y eliminación de humedad.

La recolección de este tipo de aceite es costoso y problemático así como solo se podría cubrir una pequeña demanda de biodiesel, por lo que la producción de biodiesel a partir de estos tipo de aceites, sería más bien, el reciclado y aporte ecológico que una verdadera alternativa energética.

Aceites de otras fuentes: En la actualidad se ha desarrollado una producción de aceites de composiciones similares a los aceites vegetales, a partir de diferentes organismos como: bacterias, algas, microalgas y hongos.

II.1.3.4 Síntesis de lípidos de las microalgas

En general, la composición de ácidos grasos en las microalgas incluye: moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas, la posición y el número de enlaces dobles es variable (1 a 6) y la configuración generalmente *cis*.

Los ácidos grasos de 16C a 18C son los más frecuentes, mientras que las moléculas de cadena media (10C, 12C, 14C) o largas (> 20C) predominan en algunas especies. En las microalgas dulceacuícolas generalmente prevalecen ácidos grasos saturados y mono-insaturados, observándose en menor proporción compuestos poli-insaturados (PUFAs, Polyunsaturated Fatty Acids) (Griffiths & Harrison, 2009; Garibay *et al.*, 2009).

En trabajos de investigación donde el nitrógeno es limitado, es considerado como una estrategia eficiente para incrementar el contenido de lípidos neutros en las microalgas, en particular el de triglicéridos conformados por ácidos grasos con un elevado grado de saturación.

II.1.3.5 Técnicas de cosechado

La producción de biodiesel a partir de microalgas es un proceso conformado principalmente por las etapas elementales de: producción de biomasa rica en lípidos, recuperación o cosecha de la biomasa, extracción de lípidos y transesterificación (Chisti, 2008; Schenk *et al.*, 2008).

Producción de biomasa: Cultivo masivo de microalgas en algún tipo de sistema (abierto o cerrado) para la producción de biomasa rica en lípidos.

Cosecha o recolección: El propósito es remover el agua y concentrar las células microalgales, por lo que es necesario seleccionar la técnica de cosecha más eficiente y de bajo costo. La centrifugación, sedimentación, filtración y floculación, ya sea individualmente o combinados, son las técnicas de cosecha más comunes (Dismukes *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009).

La técnica de filtración es recomendada para especies microalgales de forma filamentosas o capaces de formar colonias, presenta algunos inconvenientes en cuanto a la operación cuando se utiliza a gran escala como:

- Obstrucción de filtros.
- Formación de tortas de filtración compresibles.
- Altos costos de mantenimiento.

Las técnicas de centrifugación y sedimentación podrían ser factibles en microalgas con diámetros mayores de 5 μm y de paredes celulares gruesas. Frecuentemente estas son utilizadas en acuicultura, pero su principal desventaja es: la larga duración de la operación durante recuperación. La centrifugación resulta conveniente para productos de alto valor agregado, ya que implica altos costos y demanda un elevado consumo de energía (Garibay *et al.*, 2009)

La floculación, consiste en la aglomeración y sedimentación o flotación de la biomasa de microalgas, esta puede ser inducida de diversos modos.

La biofloculación, consiste en el uso de especies de microalgas que naturalmente floculan o cuya aglomeración puede ser inducida mediante la aplicación de condiciones de estrés tales como: cambios de pH, temperaturas extremas y limitaciones de nutrientes, es considerada como una técnica alterna.

También, se ha propuesto la floculación microbiana o co-biofloculación, técnica en la cual se adicionan microorganismos autofloculantes (levaduras) al cultivo microalgal para promover la aglomeración conjunta de éstos con la biomasa que se desea cosechar (Belter *et al.*, 1988; Schenk *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009).

De la biomasa cosechada se extraen los aceites, generalmente mediante lixiviación con solventes orgánicos (principalmente hexano). Algunos inconvenientes de esta técnica son: los costos, la energía necesaria para la recuperación del solvente y la contaminación de la biomasa microalgal libre de lípidos (Garibay *et al.*, 2009).

II.1.3.6 Extracción de aceite (lípidos) en las microalgas

La extracción de lípidos con solventes químicos ha sido utilizada generalmente para obtener lípidos de fuentes animales, vegetales y de microalgas, en el cual el solvente es adicionado a la biomasa seca o a la biomasa con cierta cantidad de agua. Gran variedad de solventes orgánicos son utilizados en la extracción de aceite de microalgas, siendo los más comunes el hexano y el etanol o mediante una mezcla hexano-etanol, es posible extraer más del 98% de los ácidos grasos presentes en la biomasa. El etanol es un buen solvente de extracción pero presenta una selectividad baja hacia los lípidos comparada con otros solventes, por lo que en extracciones con etanol, pueden aparecer otros componentes de las microalgas como azúcares, pigmentos o aminoácidos.

El sistema de extracción Soxhlet ha sido utilizado para la extracción de aceite de microalgas. El sistema consta, de un balón donde se encuentra el solvente orgánico que es calentado hasta ebullición, un tubo de extracción Soxhlet, donde es colocada la muestra, la cual va contenida en un cartucho de celulosa (dedal), y un condensador. El solvente orgánico es condensado y cae al tubo Soxhlet, en el cual extrae el aceite contenido en la biomasa hasta que el tubo se llena, cuando el tubo está lleno de solvente, este es sifonado hasta el balón que contiene el resto de solvente y se repite el proceso.

Una gran cantidad de solventes se han utilizados como solventes de extracción en el método Soxhlet, el uso de éter de petróleo es recomendado por ser un solvente no polar y selectivo al extraer lípidos no polares de las microalgas (triglicéridos), los cuales son considerados lípidos ideales para la producción de biodiesel. El éter etílico también posee esta propiedad y ya ha sido utilizado para la microalga *Neochloris oleobundans*, el inconveniente que presentan los éteres, es su alta volatilidad, lo que conlleva a una pérdida de solvente durante el proceso de extracción. El hexano también ha sido evaluado como un solvente de extracción para microalgas en el sistema Soxhlet con resultados interesantes, siendo económico, fácil de recuperar y posee selectividad hacia los lípidos neutros. Además se han utilizado mezclas de diclorometano/hexano, el cual permite

aumentar la cantidad de lípidos totales extraídos, así como la mezcla diclorometano/metanol la cual es eficiente y recupera gran cantidad de lípidos neutrales.

Por lo tanto, la extracción con solventes químicos es la técnica que más versatilidad representa, debido a la variedad de solventes orgánicos que pueden ser utilizados. Aunque si se requiere extraer la mayor cantidad de aceite de una especie de microalga, el método de Bligh y Dyer es altamente recomendable debido a que extrae tanto lípidos neutros como polares, mientras que si el objetivo es aumentar la selectividad hacia los lípidos neutros, como los triglicéridos, los cuales son los que se desean para la producción de biodiesel, es conveniente elegir un solvente apolar que sea selectivo hacia los lípidos neutros.

Un inconveniente que presentan los métodos de extracción con solvente químico son las altas cantidades de solventes que se deben utilizar para obtener cantidades significativas de aceite, esto implica mayores costos de operación, una alternativa para la disminución de estos costos es la reutilización de solvente, sin embargo, esto disminuye la eficiencia de la extracción, ya que la pureza del solvente es la fuerza impulsora de la transferencia de masa (González *et al.*, 2009).

II.2. PRODUCCIÓN DE MICROALGAS COMO MATERIA PRIMA

II.2.1 Generalidades de las microalgas

Las microalgas constituyen un grupo muy diverso de organismos unicelulares que comprenden a protistas eucarióticos y a cianofíceas del reino procariótico. Se considera uno de los grupos más versátiles en términos de su tamaño, forma y función ecológica. De la misma manera que las plantas, convierten la energía solar en energía química mediante la fotosíntesis (Albarracín, 2007).

Forman la base de la cadena alimenticia para más del 70% de la biomasa mundial y se consideran maquinarias fotosintéticas generadoras de pigmentos con una adaptación ecofisiológica y plasticidad bioquímica única; lo que les permite la bioconversión directa de la energía solar en compuestos químicos, bajo una variedad de condiciones medioambientales y a una velocidad mayor que cualquier otra fuente vegetal (Albarracín, 2007).

Las algas son componentes esenciales de los ecosistemas acuáticos. Producen oxígeno y sustancias orgánicas de las que dependen otras formas de vida, además de proveer de alimento a invertebrados y peces (Ma *et al.*, 2005).

Las algas son organismos fotosintéticos con clorofila. Muchas algas son unicelulares microscópicas, otras son coloniales y algunas han desarrollado anatomías complejas, incluso con tejidos diferenciados como las algas pardas. Las más grandes forman cuerpos laminares de decenas de metros de longitud.

Se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Su biodiversidad es enorme, se han identificado alrededor de 40,000 a 50,000 especies aunque se estima que existen más de 100,000, de las cuales con frecuencia se desconoce su composición bioquímica y metabolismo.

Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2008).

Las microalgas son fabricas celulares que guiadas por la luz solar pueden convertir el dióxido de carbono en biocombustibles, alimento, bioactivos de gran valor, bioremedios, biofertilizantes y biodiesel (Chisti, 2007).

II.2.2 Características particulares de las microalgas

Las características más relevantes de las microalgas, se mencionan a continuación (Curtis, 1985; Bousquets & Luna, 1994; Albarracín, 2007):

- Son un conjunto heterogéneo y complejo de organismos fotosintéticos, con niveles de organización semejantes, producto de evoluciones paralelas.
- Se agrupan aproximadamente 2000 géneros y 30 000 especies que presentan una notable diversidad en su forma, tamaño, estructura celular, metabolismo, composición química, ciclos de vida y hábitats.
- Son manifestaciones de una forma compleja de organización de materia y energía y como tal poseen las cualidades de alterarse, alterar y ser alterados, es decir son entidades en proceso que sufren diferentes niveles de alteración.
- La ubicación y clasificación de todos los grupos de algas se han modificado sustancialmente con la utilización del microscopio electrónico, la bioquímica, la utilización de cultivos puros en condiciones controladas y la ecofisiología experimental.
- Cada grupo tiene sus propias metodologías de colección, preservación y estudio posterior, siempre ligados a la diversidad de ambientes en la que proliferan.
- Por su capacidad fotosintética pueden alcanzar grandes rendimientos solamente con energía solar adecuada y una fuente de carbono, como el CO₂ o bicarbonatos, además de nutrientes de fácil disponibilidad.

- Algunas especies también pueden crecer sobre sustrato orgánico, en presencia o ausencia de luz.
- Tienen una eficacia fotosintética superior que las plantas, según las condiciones ambientales y de cultivo, pueden alcanzar hasta 4-8%.
- Pueden ser cultivadas todo el año y cosechadas continuamente.
- Pueden crecer en tierras marginales, en las regiones áridas del mundo, en ambientes salinos e hipersalinos de baja calidad o en aguas residuales cargadas de nutrientes.
- Su crecimiento es muy rápido, es decir crecen de manera exponencial.
- Es un valioso recurso medioambiental y biotecnológico.
- Para su cultivo, no es necesario pesticidas y herbicidas que deben usarse con los vegetales terrestres para alejar plagas.

II.2.3 Clasificación de las microalgas

II.2.3.1 División *Chlorophyta* (algas verdes)

- Presenta aproximadamente 8 000 especies y 500 géneros.
- Son organismos eucariontes (presentan núcleo verdadero y cloroplastos).
- Son fotosintéticos.
- Presentan clorofila a y b (característico color verde pasto) y carotenos.
- Almacenan las sustancias de reserva (almidón) dentro del cloroplasto.
- En el cloroplasto presentan una mancha ocular o estigma, que las guía a nadar hacia la luz.
- Cada célula es un individuo autosuficiente que sólo depende de la luz solar, del bióxido de carbono y las sales minerales del agua circundante.
- La pared celular se compone de celulosa y pectinas.
- Los organismos unicelulares móviles o las estructuras reproductivas de organismos pluricelulares presentan dos flagelos de igual tamaño y sin

ornamentaciones (llamados flagelos o látigos), insertados generalmente en el polo apical de la célula.

- Presentan un rango de diversidad morfológica que incluye organismos unicelulares móviles o no, coloniales, filamentosos simples o ramificados, uninucleados o multinucleados, foliosos, parenquimatosos y sifonáceos.
- La mayoría de las algas multicelulares están adaptadas para vivir en aguas poco profundas y en las costas.
- Se reproducen asexualmente por división celular simple, por fragmentación del talo o por esporas y sexualmente mediante gametos biflagelados (Curtis, 1985; Bousquets & Luna, 1994).

II.2.3.1.1 Género *Chlorella*

- El nombre *Chlorella* proviene del griego *Chloros*, que significa verde, y del latín *ella*, que significa cosa pequeña, y fue descubierta y nombrada por el holandés M.W. Beyerinck en 1890.
- El género contiene cerca de 10 especies.
- Es un alga verde unicelular.
- Organismo eucarionte.
- Son células pequeñas (2-12 μm), esféricas o elipsoidales y usualmente se encuentran como células individuales.
- No forma zoides y se propaga solo por autoesporas.
- Pueden encontrarse como endosimbiontes en animales invertebrados.
- Generalmente se encuentra en suelo, agua dulce y agua marina.
- Comúnmente se encuentra como contaminante de contenedores de agua.
- Forma parte del fitoplancton oceánico.
- Son especies frecuentemente usadas para investigaciones bioquímicas y fisiológicas de plantas.
- Tienen una alta diversidad genética.

- Por muchos años fueron usada en investigaciones sobre procesos de fotosíntesis.
- Son algas verdes unicelulares.
- Han sido extensamente estudiadas como una fuente factible de alimento para la población mundial.
- Produce celulosas de cadenas cortas y otros carbohidratos en la pared celular, lo cual son más fácil para la digestión.
- En crecimiento exponencial presenta un 50% de proteína, 5% de clorofila y un gran número de vitaminas.
- Es probablemente la primera alga que ha sido cultivada extensivamente en cultivos axénicos (Bold & Wynne, 1985; Hoek *et al.*, 1995).
- Es frecuente como un sistema alternativo para estudios de biología molecular de varios procesos celulares.
- Presentan un metabolismo similar a la de las plantas terrestres.
- Las células pueden ser sincronizadas.
- Las células son fácilmente manipuladas en el ambiente.
- Los cultivos celulares son fáciles, rápidos y de bajo costo de crecimiento y mantenimiento.
- Tiene el potencial de servir como vehículo en la producción de compuestos médicos, industrial e investigación importante (Dawson *et al.*, 1997).

La microalga *Chlorella* aparentemente apareció en la Tierra hace 1.5 o 2 mil millones de años. Es un microalga verde, unicelular, de agua dulce, de forma esférica, de 2-10 micras de diámetro, encontrada en agua dulce, marina, salobre, rocas, lagos y pantanos por todo el mundo, presenta una alta concentración de clorofila, por lo que su capacidad de fotosíntesis es mayor que la de otras plantas terrestres y además puede dividirse en cuatro células cada 20 horas (Kanno & Kazie, 2005).

El cultivo a gran escala de esta microalga y el uso práctico de su biomasa como fuente de ciertos constituyentes fue considerado en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial. Las primeras investigaciones fueron realizadas por un grupo de

científicos de Carnegie Institute Washington, cuyo propósito inicial fue el uso del alga verde *Chlorella* como productor de alimento (Becker, 1995).

Recientemente algunos cultivos de microalgas han sido desarrollados en equipos especializados, denominados fotobioreactores, donde se alcanzan elevadas productividades, además es posible controlar las condiciones de cultivo (cantidad de nutrientes, temperatura, iluminación y pH. Entre las microalgas de mayor importancia se encuentra *Chlorella* por su valor económico y nutricional, tanto a nivel animal como humano (Richmond, 2004).

II.2.4 Características taxonómicas de las microalgas bajo estudio

A continuación en la tabla 1 y 2, se mencionan la clasificación de las microalgas bajo estudio.

II.2.4.1 *Chlorella vulgaris*

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Chlorella vulgaris*

Dominio	Eukaryota
Reino	Viridiplantae
Phylum	Chlorophyta
Clase	Trebouxiophyceae
Orden	Chlorellales
Familia	Chlorellaceae
Género	<i>Chlorella</i>
Especie	<i>vulgaris</i>

El uso continuo del alga bajo condiciones controladas ha sido importante, con diversas posibilidades económicas. La investigación con la microalga ha demostrado que la biomasa puede ser usada para aplicaciones, como son: alimento para animales, biofertilizantes, condicionador del suelo, alimento de acuarios o puede ayudar a resolver problemas de salud pública, por medio de la purificación biológica de las aguas negras de las ciudades.

Chlorella vulgaris está siendo investigada como un nuevo recurso alimenticio (ya que una célula de *Chlorella* contiene cerca de 50% de proteínas, 5% de clorofila y un gran número de vitaminas y carotenos) para utilizarse en las poblaciones humanas pobres de todo el mundo y para proveer comida y oxígeno en viajes al espacio y en submarinos (Lee, 1995).

Morris *et al.* (1999), realizaron estudios sobre la composición bioquímica y las características del perfil aminoacídico de la microalga *Chlorella vulgaris*, cultivada en régimen autotrófico y evaluaron la calidad de su proteína mediante métodos químicos.

La microalga *Chlorella vulgaris*, es una especie con un alto rango fotosintético, puede fijar grandes cantidades de CO₂ (gas que por sus altas concentraciones en la atmósfera, ocasiona el efecto invernadero), contiene un alto contenido de proteínas, vitaminas, minerales, fibras dietéticas, componentes antioxidantes y gracias a sus componentes desintoxicadores se ha empleado como suplemento alimenticio así como para el tratamiento de aguas residuales.

Chlorella vulgaris ha sido utilizada por su calidad proteica e incluso presenta propiedades antitumorales (Noda *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 1999). Actualmente, representa un sistema biológico ideal para diferentes líneas de investigación y presenta una alta eficiencia por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio (Huss *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999; Ortega *et al.*, 2004).

Comparada con plantas, *Chlorella* tiene una alta concentración de clorofila, así que su capacidad de fotosíntesis es muchas veces mayor que la de otras plantas. *Chlorella vulgaris* puede dividirse en cuatro células cada 20 horas (Kanno & Kazie, 2005).

II.2.4.1.1 Principales usos

El cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* bajo condiciones controladas ha sido muy importante. La investigación ha demostrado que la biomasa puede ser utilizada como:

- Suplemento alimenticio.
- Alimento para diferentes organismos.
- En la acuicultura.
- Purificador biológico de aguas residuales.
- En biorremediación.
- Biofertilizantes.
- Acondicionador de suelo.

- Para resolver problemas de salud pública: Debido a que posee beneficios terapéuticos, tiene la capacidad de desintoxicar al organismo de metales pesados como el Hg, el Cd y el Pb. Además se piensa que posee la capacidad de prevenir el cáncer (Konishi *et al.*, 1996).

II.2.4.2 *Chlorella protothecoides*

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Chlorella protothecoides*

Dominio	Eukaryota
Reino	Viridiplantae
Phylum	Chlorophyta
Clase	Trebouxiophyceae
Orden	Chlorellales
Familia	Chlorellaceae
Género	<i>Chlorella</i>
Especie	<i>protothecoides</i>

Es un alga que puede hacerse crecer fotoautotrófica o heterotróficamente bajo diferentes condiciones de cultivo. El crecimiento heterotrófico ha resultado en una alta producción de biomasa y una mayor acumulación de contenido lipídico en las células (Miao & Wu, 2006).

II.2.5 Breve historia del cultivo de microalgas

- Los primeros cultivos con *Chlorella vulgaris* fueron realizados por Beijerinck en 1890.
- La idea de producir microalgas a gran escala, controlando su crecimiento, tuvo origen en Alemania en los años cuarenta, llevando a cabo el cultivo masivo de diatomeas bajo condiciones limitantes de nitrógeno.
- En 1948, el cultivo masivo de microalgas comenzó a ser realmente el centro de atención para la investigación en Stanford (USA), Essen (Alemania) y Tokio.
- Después de las experiencias previas sobre el cultivo de microalgas, la producción a gran escala comercial comenzó en Japón a principio de los años 60 con el cultivo de *Chlorella* (Tsukada *et al.*, 1977).

- La obtención de proteína a partir del cultivo de microalgas data de los años 60, cuando los Alemanes en la ciudad de Dortmund, con el afán de contribuir a solucionar problemas alimenticios, estudiaron las posibilidades proteicas de las microalgas (Uribe, 1995).
- En los años 70, se estableció e instaló en el Lago de Texcoco (México) una planta para cultivar y recolectar *Spirulina* por parte de Sosa Texcoco S.A. (Durand- Chastel, 1980).
- En 1975, en la Universidad de Colima (México), se estudió el valor nutritivo de la microalga *Spirulina gertleir*, para dietas en pollos de engorda.
- En 1977, Dai Nipón Ink. y Chemicals Inc. establecieron una planta comercial de *Spirulina* en Tailandia.
- En Latinoamérica (Sausal, Perú) en 1978, se comenzó la producción semi-industrial de microalgas, después de los buenos resultados de estudios realizados sobre la posibilidad de la producción masiva de la microalga *Scenedesmus acutus var alternans* (Castillo, 1978).
- En 1980 existían en Asia 46 factorías a gran escala produciendo más de 1000 kg de microalgas por mes de *Chlorella* (Kawaguchi, 1980).
- En 1986, la producción comercial de *Dunaliella salina* como fuente de β -caroteno llegó a ser la tercera mayor industria del cultivo de microalgas cuando Western Biotechnology Ltd. y Betatene Ltd. establecieron en Australia instalaciones de producción.
- En 1988, Mule determinó el contenido proteico de las cianofitas en aguas residuales, con miras al aprovechamiento proteínico para la alimentación.
- En 1996, Japón comercializó cerca de 2000 toneladas de *Chlorella* (Lee, 1997).
- Pronto fueron instaladas otras plantas comerciales en Israel y USA y en un corto período de unos 30 años, la industria de la biotecnología de microalgas ha crecido y se ha diversificado significativamente.
- Las investigaciones sobre el cultivo y utilización de las microalgas en la alimentación es un tema relativamente reciente (García *et al.*, 1993).
- Actualmente varias especies de microalgas son cultivadas comercialmente en algunos países y la biomasa producida ha sido utilizada en la industria

de alimentos. El mercado de alimentos funcionales, utilizando microalgas en panes, yogurt y bebidas, presenta rápido desarrollo en países como Francia, Estados Unidos, China y Tailandia (Pulz & Gross, 2004).

En resumen, la historia sobre el cultivo y utilización de microalgas a partir de poblaciones naturales data de varios centenares de años: *Nostoc* en Asia y *Spirulina* en África y México (Spolaore *et al.*, 2006).

II.2.6 Importancia del cultivo de microalgas

El género *Chlorella*, era utilizado para investigaciones de nutrición mineral y fotosíntesis, y muy pocas algas eran cultivadas en laboratorio. Por lo tanto la ficología solo dependía exclusivamente de las colecciones colectadas en campo.

Briefly desarrolló experimentos del crecimiento de microalgas en laboratorio haciendo posibles grandes avances en nuestro conocimiento de taxonomía de microalgas, fisiología, ciclos de vida, ultraestructura, bioquímica, ecología y genética.

Las algas proporcionan nutrientes de diversa naturaleza y composición química. Cuando las microalgas se cultivan en forma masiva, pueden constituir una fuente importante de materia prima, permitiendo la obtención de sustancias tales como ácidos grasos, glicerol, pigmentos, polisacáridos, compuestos bioactivos, inhibidores enzimáticos, antibióticos y antifúngicos, así como disponer de biomasa celular rica en proteínas para el consumo animal o humano, el tratamiento de aguas residuales y la generación de energía (gas metano, alcohol, bioetanol, biodiesel) (Ramos & Salazar, 1990).

El cultivo de microalgas constituye potencialmente la forma más interesante, ya que pueden sintetizar sus propios alimentos de manera similar a las plantas de origen terrestre y además son la fuente primaria de la cadena trófica de alimentación de muchos organismos acuáticos.

El cultivo de microalgas para la obtención de lípidos y producción de biodiesel, requiere de innovación tecnológica constante con el fin de evitar la utilización de recursos no renovables, cuyo uso dañe el medio ambiente o ponga en riesgo los recursos de las generaciones futuras.

La acuicultura es una de las áreas de más rápido desarrollo en el campo de la producción alimenticia y las microalgas son el punto de partida biológico para el inicio del flujo de energía en las cadenas alimenticias acuáticas (Abalde & Herrero, 2004).

Las microalgas fueron elegidas porque existen numerosas especies que son ricas en triglicéridos, es decir la materia prima para la obtención de biodiesel. El cultivo de microalgas presenta muchas ventajas con respecto a los cultivos terrestres (Monthieu, 2010):

- Presentan una alta tasa de crecimiento.
- Producción de aceite por área mayor que los cultivos terrestres.
- No requieren de grandes superficies para su producción.

A principios de los años 50, comenzó a utilizarse el cultivo de microalgas a gran escala en el tratamiento de aguas residuales urbanas junto con la producción de biomasa rica en proteínas como alimento para ganado (Oswald, 1988; Laliberté *et al.*, 1997).

Durante los años 70, se comenzaron a realizar notables investigaciones sobre el estudio de fuentes alternas de energía, como una manera preventiva por la escasez y encarecimiento de productos derivados del petróleo. Por lo que, la conversión biológica de la energía solar atrajo gran interés a escala mundial. Dado que las microalgas constituyen un sistema eficiente para la captación de energía solar, existió un continuo interés en el cultivo de microalgas para la producción de compuestos de interés energético (Vega *et al.*, 1983).

A finales de los años 70, Estados Unidos estudió la producción de nuevos biocombustibles, con el fin de prever la decadencia del petróleo. Estos estudios fueron realizados sobre el cultivo de microalgas, siendo la base para una fuente prolífica de biodiesel. Hoy en día, diferentes empresas y laboratorios de investigación persiguen este trabajo, procurando optimizar la bioproducción y las técnicas de extracción de microalgas (Monthieu, 2010).

En los años 80, los problemas económicos derivados de la producción masiva de microalgas catalizaron el desarrollo de nuevas experiencias destinadas a obtener un mayor valor añadido de la biomasa producida. Por lo que, se visualizaron otros usos distintos de la alimentación humana y animal, produciéndose un notable aumento de trabajos de investigación destinados a la obtención de compuestos de interés comercial y alto valor añadido. Este campo de la biotecnología de microalgas aún está dando sus primeros pasos, ya que todavía son pocas las microalgas cultivadas a gran escala y las moléculas de valor producidas (Pulz & Gross, 2004).

El cultivo decidido de microalgas tan sólo tiene pocas décadas. Durante el siglo 20, los investigadores y productores comerciales han desarrollado varias tecnologías de cultivo que hoy en día se encuentran en uso para producir biomasa

de microalgas: estanques abiertos, fotobioreactores cerrados y reactores de fermentación. Por tanto, el éxito de la producción de microalgas a gran escala depende de muchos factores y uno de ellos es el desarrollo de grandes sistemas de cultivo para las microalgas de costo efectivo y el desarrollo de éstos ha sido y sigue siendo un proceso gradual (Becker, 1994; Tredici, 1999).

Existen investigaciones a escala de laboratorio sobre el cultivo de microalgas con productos de naturaleza zeolítica, proporcionando resultados muy alentadores (López-Ruíz *et al.*, 1995; Voltolina *et al.*, 1997) así como en estanques (Ge *et al.*, 1995).

Por lo tanto, las investigaciones sobre el cultivo de microalgas revisten una gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y comercial. Por tal motivo, se han utilizado los cultivos discontinuos por su fácil manejo, para determinar la cinética de crecimiento y los parámetros que influyen en el desarrollo poblacional de las microalgas. Además el uso de medios de cultivo sintéticos ha incrementado sustancialmente el valor económico para la producción de biomasa (Abalde *et al.*, 1995; González *et al.*, 1999).

Además, en los últimos años se ha despertado un gran interés en la producción masiva de microalgas, eligiéndose aquellas especies que presentan las mejores características de crecimiento y adaptabilidad a los sistemas de cultivo y que además, cubran los requerimientos nutricionales de las especies animales y de producción de biomasa.

Las microalgas pueden ser: autótrofas, auxótrofas y heterótrofas de acuerdo a la obtención de sus nutrimentos. Se denominan autótrofas cuando son capaces de satisfacer sus requerimientos nutricios solo de fuentes inorgánicas y de luz como fuente de energía para su desarrollo. Auxótrofas, son aquellas incapaces de crecer sin un suministro de compuestos orgánicos específicos que no pueden sintetizar por ellas mismas como las vitaminas (B₁₂). Heterótrofas son aquellas que obtienen el carbono y tal vez el nitrógeno, el fósforo y el azufre que requieren a partir de fuentes orgánicas disueltas.

Las microalgas microscópicas se desarrollan en tanques de distinta capacidad, a los que se añaden todas las sustancias inorgánicas y orgánicas requeridas. En estos tanques se controla la luz, el pH, la salinidad, la temperatura y el resto de los factores vitales que intervienen en el proceso. Parece imposible controlar la totalidad de los factores que rigen el desarrollo de una especie, pero cuanto más se controlen, más se acerca al ideal (Albarracín, 2007).

II.2.7 Las microalgas como nutrientes

Desde el punto de vista nutricional, las microalgas son una fuente de macronutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos), micronutrientes (vitaminas y minerales), lípidos (ácidos grasos esenciales) y pigmentos.

La concentración de proteínas, carbohidratos y lípidos de las microalgas puede modificarse alterando las condiciones ambientales como: concentración de nutrientes, temperatura, intensidad luminosa, fotoperiodo, salinidad, fuente de carbono, así como el estado fisiológico: especie, edad de la población, densidad de la población y desarrollo autotrófico o heterotrófico (Gudinn & Thepenir, 1986).

Proteínas

El contenido de proteínas en las microalgas puede variar de un 30 a un 65 % de su peso seco. El valor nutricional de las proteínas esta determinado por el contenido y proporción de los aminoácidos, estos no varían entre las diferentes especies de microalgas, por lo tanto las diferencias en la calidad nutricional de las microalgas, en la mayoría de los casos no esta relacionada con la composición de los aminoácidos.

La producción de proteínas depende de los requerimientos de la especie en particular y se ve afectado conforme aumenta o disminuye la cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo, debido a la relación nitrógeno:fósforo (N:P). El contenido de proteínas decrece también proporcionalmente con el incremento de la edad del cultivo (Becker, 1986; Webb & Chu, 1983).

Carbohidratos

La composición de carbohidratos, en términos de azúcares específicos puede variar considerablemente entre las especies de microalgas. Generalmente la glucosa se encuentra en concentraciones mayores, seguido por la galactosa, manosa, ribosa y otros azúcares en proporciones variables.

Los azúcares pueden presentarse como monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Han sido pocos los análisis detallados sobre la composición de los carbohidratos de las microalgas (Whyte, 1987).

La concentración de nitrógeno afecta el contenido de carbohidratos por célula. Cuando las concentraciones de nitrógeno se incrementan, el contenido total de carbohidratos de los cultivos se incrementa proporcionalmente a la concentración de nitrógeno.

La intensidad de la luz, es otro factor que afecta la composición bioquímica de las microalgas, se ha observado que la producción de carbohidratos se incrementa de manera proporcional a la intensidad de la luz (Schmidt, 1999).

Lípidos

Gran parte de los lípidos de las microalgas son ésteres de glicerol y ácidos grasos. La composición de los lípidos puede variar por diversos factores como son: la combinación de la luz, nutrientes, nitrógeno (nitratos) y temperatura.

La fracción lípídica puede dividirse en dos grupos principales: los lípidos polares (glicolípidos y fosfolípidos) y los lípidos neutros (triglicéridos, diglicéridos, hidrocarburos, alquenonas, esteroides y pigmentos) (Brown *et al.*, 1989).

La mayoría de los lípidos microalgales son lípidos polares que son componentes de membrana; mientras que los triglicéridos son una reserva de ácidos grasos para la división celular, energía metabólica, mantenimiento de la membrana, síntesis y una amplia variedad de funciones fisiológicas. Los triglicéridos pueden llegar a constituir hasta el 80% del total de lípidos en microalgas eucariotas.

Las cantidades relativas de cada clase de lípido en las células microalgales pueden cambiar considerablemente con variaciones de las condiciones de cultivo (Abalde *et al.*, 1995).

En las algas verdes, los ácidos grasos saturados pueden constituir del 15 al 30% de los ácidos grasos totales. Las microalgas verdes presentan bajas concentraciones de ácidos grasos monoinsaturados (5-20%) y altas concentraciones de poliinsaturados (50-80%) (Schmidt, 1999).

Pigmentos

Los pigmentos de muchas algas son la clorofila verde y amarilla y los carotenoides anaranjados o rojos, los cuales contribuyen entre 0,5-5% del peso seco de la célula.

La clorofila "a" es el principal pigmento fotosintético en todas las algas, su complemento es la clorofila "b" que es fundamental junto con la clorofila "a" en las algas verdes.

Minerales

La fracción mineral de la microalga puede constituir una proporción del peso seco, en un rango del 6 al 39%. Las microalgas proporcionan una fuente de minerales aunque también trazas y iones de metales pesados, los cuales pueden

tener desventajas si estos metales son tóxicos. Entre los iones de mayor importancia bioquímica que se encuentran en las microalgas son: fósforo, sílice, magnesio, calcio, sodio, potasio, cloro, fierro, zinc, manganeso, cobre y cobalto (Schmidt, 1999).

Vitaminas

Las microalgas son fuente significativa de casi todas las vitaminas. Las vitaminas que generalmente contienen las microalgas son: tiamina (B₁), riboflavina (B₂), piridoxina (B₆), cobalamina (B₁₂), biotina, ácido ascórbico, ácido pantoténico, colina, inositol, tocoferol (E) y B-carotenos (provitamina A) (Schmidt, 1999).

II.2.8 Parámetros que regulan el crecimiento de las microalgas

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las microalgas son según Barsanti *et al.* (2006) los siguientes:

Nutrientes

Los elementos inorgánicos considerados requeridos para el crecimiento de las microalgas son: C, O, N, P, S, Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, B, Br, Si, Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al y vitaminas.

Temperatura

La mayoría de la especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27°C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada. Un valor intermedio de 18-20°C es frecuentemente empleado. Temperaturas por debajo de los 16°C pueden retardar el crecimiento, mientras que aquellas por arriba de los 35°C son letales para cierto número de especies.

Luz

Como en las plantas, la luz es la fuente de energía que promueve las reacciones fotosintéticas en las microalgas. Aquí, la intensidad, la calidad espectral y el fotoperiodo deben ser considerados.

pH

El rango de pH para la mayoría de las especies de microalgas cultivadas es entre 7 y 9, siendo el rango óptimo 8.2-8.7. Para mantener un pH aceptable es necesario airear el medio de cultivo.

Aireación

La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de las microalgas y para asegurar que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y a los nutrientes, así como para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire.

II.2.9 Fases de crecimiento en el cultivo de microalgas

Las microalgas crecen al igual que las bacterias, es decir de manera exponencial y rápida. (Derner *et al.*, 2006).

En los cultivos semicontinuos, la cosecha se realiza durante la fase exponencial de crecimiento y conforme los cultivos entran en fase estacionaria.

- El medio de cultivo, es inoculado con una cierta cantidad de cel mL⁻¹ (densidad celular) en un matraz Erlenmeyer de un litro de capacidad, conteniendo 750 mL de medio de cultivo.
- Después de la inoculación estas células crecen y se dividen cada vez más deprisa conforme se van aclimatando a las condiciones de cultivo. Esta **fase de aclimatación**, que dura de 2 a 3 días, se llama **fase de inducción**.
- Una vez se adaptan a las condiciones, la velocidad de división celular se acelera y el crecimiento del número de células en el cultivo se hace exponencial. Este período dura de 4 a 6 días y se denomina **fase de crecimiento exponencial**.
- La velocidad de división celular se va haciendo lenta conforme se va limitando la penetración de la luz a través del cultivo o los nutrientes. Es entonces cuando el cultivo entra en la **fase estacionaria**, que puede durar muchos días. Es necesario cosechar el cultivo posteriormente, debido a que se pueden producir metabolitos autoinhibidores o tóxicos (Derner *et al.*, 2006).

II.2.10 Especies de microalgas que producen aceite

II.2.10.1 Contenido de aceite de algunas especies de microalgas

Para la determinación del contenido de aceites de las microalgas es complicada, a causa de su variación ante condiciones distintas de cultivo, el crecimiento en ambientes desfavorables o bajo situaciones de estrés, esto frecuentemente conlleva al incremento de la fracción lipídica, aunque en detrimento de la productividad lipídica del cultivo. Los lípidos en las microalgas por lo general constituyen del 20 al 50% de su peso seco, aunque se han reportado valores en un rango del 1 al 80%, o incluso superiores (Tabla 3 y 4) (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Mayfield, 2008; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009; Garibay *et al.*, 2009).

Tabla 3. Contenido lipídico de algunas microalgas en condiciones autotróficas.

Especie	% lípidos (masa seca)
<i>Ankistrodesmus</i> TR-87	28 - 40
<i>Botryococcus braunii</i>	29 - 75
<i>Chlorella protothecoides</i> (autotrófica / heterotrófica)	15 - 55
<i>Cyclotella</i> DI-35	42
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	36 - 42
<i>Hantzschia</i> DI-160	66
<i>Isochrysis</i> sp.	7 - 33
<i>Nannocloris</i>	31 (6 - 63)
<i>Nannochloropsis</i>	46 (31 - 68)
<i>Nitzschia</i> TR - 114	28 - 50
<i>Phaeodactylum tricomutum</i>	45
<i>Scenedesmus</i> TR-84	33 (9 - 59)
<i>Stichococcus</i>	31
<i>Tetraselmis suecica</i>	15 - 32
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	(21 - 31)

Tabla 4. Contenido lipídico de algunas microalgas en condiciones autotróficas y heterotróficas.

Producción de lípidos de algunas especies de microalgas		
Especie	% lípidos	Referencia
<i>Nannochloris sp</i>	34	Yamberi <i>et al.</i> (1998)
<i>Nannochloris sp</i>	50.9	Takagi <i>et al.</i> (2000)
<i>Chlorella protothecoides</i>	57.8	Xiong <i>et al.</i> (2008)
<i>Chlorella emersonii</i>	63	Illman <i>et al.</i> (2000)
<i>Chlorella sp</i>	57	
<i>Chlorella vulgaris</i>	40	
<i>Chlorella vulgaris</i>	56.6	Liu <i>et al.</i> (2008)
<i>Dunaliella sp</i>	67	Takagi <i>et al.</i> (2006)
<i>Neochloris oleoabundans</i>	34	Estudio actual
<i>Botryococcus braunii</i>	25 - 75	Chisti (2007)
<i>Chlorella sp</i>	28 - 32	
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20	
<i>Cylindrotheca sp</i>	16 - 37	
<i>Dunaliella primolecta</i>	23	
<i>Isochrysis sp</i>	25 - 33	
<i>Monallanthus salina</i>	>20	
<i>Nannochloris sp</i>	20 - 35	
<i>Nannochloropsis sp</i>	31 - 68	
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35 - 54	
<i>Nitzschia sp</i>	45 - 47	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20 - 30	
<i>Schizochytrium sp</i>	50 - 77	
<i>Tetraselmis sueica</i>	15 - 23	
	Limitación de nitrógeno	
	% lípidos	
<i>Chlorella emersonii</i>	63	Reintan <i>et al.</i> (1994) Wang <i>et al.</i> (2008)
<i>Chlorella minutissima</i>	56	
<i>Chlorella vulgaris</i>	57.9	
<i>Chlorella luteoviridis</i>	28.8	
<i>Chlorella capsulata</i>	11.4	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	29.2	
<i>Neochloris oleoabundans</i> (deficiente de nitrógeno)	35 - 54	Tornabene <i>et al.</i> (1983)

Especie	Valor calórico/biomasa microalgal	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i> (condición normal)	18-21 KJ g ⁻¹	Illman <i>et al.</i> (2000)
<i>Chlorella vulgaris</i> (suficiente nitrógeno)	18 KJ g ⁻¹	
<i>Chlorella vulgaris</i> (deficiente de nitrógeno)	23 KJ g ⁻¹	
<i>Chlorella emersonii</i> (deficiente de nitrógeno)	29 KJ g ⁻¹	
Bióxido de carbono (CO₂)		
<i>Chlorococcum littorale</i> (alga marina)	Tolerancia a altas concentraciones de CO ₂ - arriba del 40%	Iwasaki <i>et al.</i> (1997)
<i>Chlorella sp</i>	Alta tasa de fijación de CO ₂ , excediendo 1 g CO ₂ L ⁻¹	Murakami & Ikenouchi (1997)
<i>Chlorococcum littorale</i> (alga marina)		
<i>Botryococcus braunii</i>		
	Alta tasa de fijación de CO ₂ , recomendada para la producción de biodiesel	
Especie	% lípidos	Referencia
<i>Scenedesmus obliquos</i>	43 (dcw) Fase estacionaria - Deficiente en nitrato x 7 días	Mandal & Mallick (2009)
<i>Scenedesmus obliquos</i>	29,5 (dcw) Fase estacionaria - Deficiente en fosfato x 3 días	Mandal & Mallick (2009)

II.2.11 Métodos de cultivo

El cultivo de microalgas a nivel industrial estaba bien desarrollado ya en años cuarenta, es en las dos últimas décadas que se han intensificado las investigaciones tendientes a mejorar los sistemas de producción (Albarracín, 2007; Barraza *et al.*, 2009).

Hay dos diseños básicos para la producción a gran escala de estas microalgas:

- Sistemas abiertos: En los que el cultivo está expuesto a la atmósfera, por ejemplo:

Cultivo en estanques al aire libre: La forma más simple de cultivo. Se trata básicamente de piscinas descubiertas y expuestas al sol. Al agua se le suministran nutrientes para que las microalgas puedan reproducirse a un ritmo acelerado. Es el sistema menos eficiente pero económico, a nivel industrial no resulta rentable. Generalmente ocupan grandes áreas de terreno, cuestan menos para construir y operar, la baja densidad celular origina varios inconvenientes: baja productividad, fácil contaminación, costosa recuperación del producto de medios diluidos y dificultad para el control de la temperatura (Chisti, 2007).

Cultivo de tanques en invernadero: Los tanques de agua en los cuales se reproducen las microalgas están protegidos por invernaderos. Las ventajas de este sistema son: un mejor control de la temperatura y una pérdida reducida de agua. Estos factores favorecen una mayor reproducción de las microalgas y rendimiento. Existen empresas productoras que optan por este sistema por considerarlo, un buen equilibrio entre la eficiencia de producción y los costos.

- Sistemas cerrados, denominados fotobioreactores, por ejemplo:

Cultivo en fotobioreactores: Son conductos transparentes aislados del exterior en los cuales se desarrollan las microalgas. Estos tubos se colocan en el exterior para captar mayor cantidad de radiación solar. Las microalgas no sólo reciben la radiación natural sino que aprovechan también la radiación artificial. Los fotobioreactores también pueden ser situados dentro de invernaderos de plástico o de cristal para así disponer de una temperatura ambiente más elevada. A continuación se describen brevemente algunos tipos:

- Tubos de plástico o vidrio de forma triangular: Gases como CO_2 y O_2 se hacen fluir desde la parte baja de la hipotenusa y las microalgas con medio de cultivo se hacen fluir en sentido opuesto.
- Tubulares en forma horizontal: Son tubos de acrílico en el que se hace circular en forma horizontal medio de cultivo más microalgas para que estas no precipiten y todas reciban la misma cantidad de luz y nutrientes.
- Columna vertical de burbujas: Se genera circulación del medio con microalgas en una columna vertical a través del flujo de gases como dióxido de carbono. Se ilumina a través de tubos de luz a lo largo del tubo, cuyo objetivo es disminuir el costo del cultivo de microalgas a gran escala y hacerlo más simple.
- Equipos de fermentación: Crecimiento de microalgas alimentadas con algunos azúcares como fuente de carbono.

Chisti (2007), menciona que las principales ventajas de utilizar fotobioreactores son:

- Facilidad para cosechar la biomasa.
- Mantenimiento del cultivo sin contaminación.
- Mejor control de las condiciones de cultivo.
- Menor inversión de capital (costo de producción).

II.2.12 Potencial de las microalgas para producir aceites

Los aceites vegetales son la principal materia prima para la producción de biodiesel, razón por la cual el uso de cultivos de alto contenido oleaginoso ha sido estudiado exhaustivamente. Los principales materiales oleaginosos utilizados derivan de la palma, colza y soya, además del girasol, coco, cacahuete, oliva, mostaza, entre otros. El mercado creciente de producción de biodiesel a partir de aceites vegetales comestibles, requeriría del uso de enormes extensiones de terreno fértil, situación que podría conllevar a crisis alimentarias ante la escasez de suelos cultivables (Ma & Hanna, 1999; Al-Zuhair, 2007; Li *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2008).

En el caso particular del sureste asiático y Brasil, el considerable incremento en su tasa de producción de biodiesel a partir de palma y soya, ha ocasionado problemas ambientales inherentes a la deforestación de regiones tropicales (Dismukes *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008). En consecuencia se ha planteado el uso de aceites no comestibles procedentes de cultivos marginales tales como *Jatropha curcas* (piñón), *Calophyllum inophyllum* (tamanu), *Pongamia pinnata* (haya de la India, karanja), *Madhuca indica*, *Swida wilsoniana*, *Ricinus communis* (higuerilla) y *Vernicia fordii* (tung). Estos cultivos marginales no requieren de terrenos fértiles, ya que proliferan en suelos áridos, pobres en nutrientes, con altos niveles de radiación y baja precipitación pluvial (Fairless, 2007; Liu & Zhao, 2007; Sharma *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008).

El elevado costo de la materia prima, que contribuye del 50 al 90% del precio de producción del biodiesel, ha obstaculizado la comercialización del biocombustible, motivo por el que se ha propuesto el uso de aceites de desecho y de grasas animales, alternativa que no ha sido satisfactoria a causa de los gastos adicionales necesarios para el refinamiento y la transesterificación del material (Al-Zuhair, 2007; Liu & Zhao, 2007; Song *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009). En el 2007, la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales (comestibles y no comestibles, vírgenes y usados) y grasas animales (12 Mtons) correspondió al 0.3% del consumo global de petróleo (3952.8 Mtons), situación que constata la

incapacidad de estas fuentes para desplazar la demanda actual y futura de combustible (BP Statistical Review of World Energy 2008; Schenk *et al.*, 2008).

Las microalgas han sido sugeridas como buenas candidatas para la producción de biomasa, obtención de aceites y su posterior producción de biodiesel, debido a sus avances de alta eficiencia fotosintética, alta producción de biomasa y el crecimiento más rápido en comparación con otras cosechas energéticas. Los principales componentes de la fracción lipídica son triacilglicerolos, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos, fosfolípidos y pigmentos. Además pueden estar presentes compuestos como: ácidos grasos halogenados e hidroxilados y alquenonas de cadena larga (Cohen, 1986; Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Metzger & Largeau, 2005; Guschina & Harwood, 2006; Hu *et al.*, 2008; Garibay *et al.*, 2009).

No todos los lípidos de las microalgas son esenciales para la obtención y producción de biodiesel, sin embargo los más apropiados son: ácidos grasos, libres, unidos covalentemente al glicerol y sus derivados. Además constituyen la mayor fracción de los lípidos totales, usualmente del 20% al 40% (Cohen, 1986; Chisti, 2007).

III. PROSPECTIVA DE LAS ENERGÍAS RENOVABLES

III.1 Barreras en el desarrollo de las Energías Renovables en México

Una de las principales barreras, son las institucionales debido a que la planeación energética del país está basada en metodologías, donde se evalúan sólo el costo económico de corto plazo de la generación de energía. La falta de valoración de los beneficios que las energías renovables aportan a la economía nacional tales como: la estabilidad de precios de la energía en largo plazo, la reducción de riesgos en el abasto energético y los recursos energéticos fósiles nacionales, hace que las políticas y prospectivas energéticas nacionales sigan basándose en combustibles fósiles (Torres & Gómez, 2006).

Legales y Regulatorios: Existen ciertas limitaciones constitucionales y legales en la participación privada en el Sector Energía.

Económicos y Financieros: Es necesario establecer incentivos económicos, fiscales y financieros que permitan que las Energías Renovables (ER) puedan ser competitivas frente a las fuentes convencionales. Los esquemas de financiamiento en México han sido insuficientes para el fomento de las energías renovables, por lo que es necesario impulsar este tipo de mecanismos.

Técnicos: Se han realizado esfuerzos para estimar el potencial de las Energías Renovables (ER) en México así como estudios para evaluar el recurso geotérmico de Comisión Federal de Electricidad (CFE), los mapas eólicos y solares

elaborados por Gobiernos Estatales y Organismos Internacionales. Estos esfuerzos, no han abarcado todo el territorio nacional ni han considerado otros recursos como: la mareomotriz, la geotermia de baja entalpía, el biogás de residuos urbanos, agronómicos y la biomasa de plantaciones energéticas y de microalgas (Torres & Gómez, 2006).

III.2 Prospectiva (Visión hacia el 2030) de las Energías Renovables en México.

La Secretaría de Energía (SENER) prevé como escenario, que la oferta de la energía primaria se duplicará entre 2002 y 2030, el gas natural tendrá una tasa de crecimiento anual del 3.5%, la demanda de petróleo se estima en 3.4 millones de barriles diarios (2030), la hidroenergía crecerá 2.3% por año, la biomasa y desechos un 3.7% y otras energías renovables un 4.1%.

El desarrollo de las Energías Renovables (ER) ha empezado a ser importante por las reducciones en los costos de inversión, operación y mantenimiento derivados de mejoras tecnológicas, por lo que es necesario seguir impulsando a nivel nacional su investigación y desarrollo tecnológico (Torres & Gómez, 2006).

Existe una importante red de investigación en materia de Energías Renovables (ER) en México, que incluye instituciones tanto del sector público como privado, los cuales han impulsado proyectos que buscan promover y apoyar la innovación tecnológica y establecer lineamientos en materia de investigación referente a las mismas.

México está en proceso de mejorar significativamente su marco regulatorio y legal, con el propósito de impulsar el desarrollo de tecnologías basadas en energías renovables y asegurar que éstas obtengan la retribución económica correspondiente.

Por lo tanto, es necesario que en México se fortalezcan los grupos de investigación en energías renovables, ya que actualmente cuentan con recursos limitados, resultando en un desarrollo tecnológico todavía incipiente en nuevas áreas como la producción de combustibles líquidos, la gasificación de biomasa y la producción de hidrógeno. Además tiene que ir liberándose de su dependencia de los hidrocarburos para generar electricidad y no esperar el agotamiento de sus reservas o el descubrimiento de nuevas. La solución debe encontrarse en el aprovechamiento de nuevas fuentes de energía de tipo renovable.

III.3 Perspectiva a futuro de la producción de biomasa a través del cultivo de microalgas.

El punto principal se centra en la diversificación energética y disminución de la dependencia energética externa, así como en el ahorro energético y en la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero. El papel que juegan las microalgas para la producción de biomasa, obtención de aceite y producción de biodiesel (biocombustible) es importante, aunque su participación será a largo plazo, puesto que este sector se encuentra en la fase de investigación y desarrollo tecnológico previa al desarrollo a planta piloto y a nivel comercial a gran escala.

Las microalgas son un grupo de organismos fotosintéticos diverso que han colonizado una amplia variedad de ecosistemas acuáticos y terrestres, por su alta plasticidad y diversidad metabólica. Es necesario explorar la alta diversidad que presentan, de las aproximadamente 100.000 especies de algas que se estiman que existen, el 90% están aún por valorarse (Bioplat, 2006).

Este nuevo sector sobre el cultivo de microalgas presenta una serie de ventajas potenciales:

- Alta eficiencia fotosintética.
- Pueden cultivarse en agua de mar, agua salobre, agua dulce y efluentes residuales (aprovechando el CO₂ de procesos industriales).
- Presenta una alta tasa de crecimiento.
- Producción de aceite por área mayor que los cultivos terrestres.
- No requieren de grandes superficies para su producción.

Para poder alcanzar el éxito en la producción sostenible de microalgas con fines energéticos, resulta necesario el desarrollo de un plan nacional de (I+D), con el compromiso asociado de financiarlo a largo plazo y contar con la tecnología renovable para fomentar su desarrollo. Este plan deberá estar estructurado por tres criterios: balance energético positivo, balance ecológico positivo y que sea económicamente competitivo frente a los combustibles fósiles convencionales (Bioplat, 2006).

Por lo tanto, se requiere fomentar la investigación y desarrollo, mediante la colaboración conjunta de científicos y tecnólogos de diferentes áreas y de empresas involucradas en el sector. A través de una investigación integrada que conecte la escala de laboratorio hasta la planta piloto e industrial, así como con la participación de grupos de investigación y empresas, será posible un avance firme

en la obtención de aceite y producción de biocombustibles a partir de la biomasa de microalgas.

La investigación, el desarrollo tecnológico, las mejoras en la eficiencia energética, la reducción de costos de producción, el desarrollo e implantación de criterios de sostenibilidad y la aplicación eficaz de medidas de fomento del uso de la bioenergía, serán aspectos decisivos en el desarrollo de esta fuente de energía.

En conclusión, el papel que juegan las microalgas para la producción de energía renovable será importante, aunque su participación será a largo plazo. Actualmente es un sector con gran potencial, pero que se encuentra en la fase de investigación y desarrollo tecnológico previa al desarrollo comercial a planta piloto y gran escala.

La producción actual de biomasa a través de microalgas para la obtención de biocombustibles es muy reducida, aunque tiene un potencial enorme. Actualmente el principal destino de producción de biomasa es para la alimentación, farmacéutica, cosmética etc. Posteriormente grandes esfuerzos en investigación y desarrollo tendrán que ser necesarios en las etapas de cosechado y valorización de la misma (Bioplat, 2006).

Hasta hace poco tiempo, la ficotecnología (la ficología aplicada y la agronomía marina) estaba acotada a pequeños grupos de investigación científica, sin embargo durante los últimos años han aumentado de forma exponencial los anuncios de proyectos relacionados con la biotecnología de microalgas. La causa de este cambio se encuentra en las ventajas potenciales que este nuevo sector posee frente a las tecnologías y cultivos convencionales de producción de biomasa. La prueba de las expectativas que esta tecnología está despertando está, en que grandes empresas internacionales, departamentos de defensa, energía y medio ambiente de países líderes invierten en cantidades significativas en ficología aplicada.

Finalmente, se podría decir que independientemente de que se alcance o no el objetivo de producir biocombustible, el desarrollo de programas impulsará la emergencia de un nuevo sector bioindustrial, relacionado con la producción de: alimentos para consumo humano, piensos, acuicultura, pigmentos, dermocosmética, nutracéutica, biomedicina, tratamiento de aguas y gases contaminantes, industria climática, etc. Incluso es más probable que estas nuevas bioindustrias tengan que ser desarrolladas como complemento para hacer rentable la producción de biocombustibles de microalgas (Bioplat, 2006).

Los futuros sistemas de producción de biomasa a través de microalgas para la producción de biocombustibles, debe considerar dos características fundamentales, con el propósito de que tengan un impacto significativo en la demanda de energía a escala nacional o global:

- Ser sistemas medioambientalmente sostenibles: no ocupando suelo fértil, con balance energético positivo (con un balance de emisiones de gases de efecto invernadero realizado con técnicas de ciclo de vida que permita reducciones apreciables frente a los combustibles fósiles), que no contaminen el medio, con el mínimo empleo de fertilizantes, minimizando el consumo de agua y no utilizando agua de consumo humano.
- Ser rentables, con costos de producción competitivos (a medio-largo plazo), contar con un proceso de producción idóneo y escalable, espacio y tiempo (sistemas hiper-intensivos) y la comercialización del proceso y producto.

Se considera una solución eficiente, la utilización de sistemas integrados, que consisten en el uso de efluentes ricos en nutrientes como medio de cultivo alternativo, que no sólo abarata la producción de la biomasa de microalgas sino que también funcionan como un servicio ambiental (depuración de las aguas).

Una vez establecidos los requisitos previos de balance ecológico y energético neutro o positivo, se presentan las siguientes opciones:

- Procesos fotosintéticos.
- Para el cultivo de microalgas, se precisa una selección de áreas idóneas que combinen altas tasas de insolación y rangos de temperaturas moderadas (entre 20-35 °C), reuniendo las condiciones ambientales que optimicen la producción.
- Utilizar sistemas multi-integrados, empleando efluentes ricos en nutrientes y CO₂ como medio de cultivo.
- Desarrollo de una nueva agronomía sustentada en especies de ambiente marino, salobre o hipersalino.
- Utilizar agua dulce que no se emplee para consumo humano o agrícola, aguas procedentes de tratamiento secundario de aguas residuales, agua contaminada con nitratos y fosfatos procedentes de usos agrícolas y efluentes industriales acuosos.

Las microalgas son organismos fotosintéticos que fijan el CO₂ y para su producción masiva requieren de un aporte considerado de este gas o de aire enriquecido (como fuente de carbono así como para la regulación del pH del medio de cultivo). Actualmente el costo del CO₂ resulta caro, pero podría reducirse empleando fuentes alternativas, aprovechando el precedente de fuentes emisoras

de este gas (industria energética) o del contenido en efluentes procedentes de actividades respiratorias bacterianas, piscifactorías, etc.

La posibilidad de cultivar microalgas tanto en agua dulce, marina y efluentes residuales, constituye una de las principales ventajas de estos organismos. Además se deben valorar el resto de las ventajas que presentan las microalgas, de manera que estas puedan conducir a una estrategia de ayuda a la investigación y el desarrollo. Esto conducirá que al menos en las fases iniciales del desarrollo tecnológico (situación actual del sector de las microalgas) permita mayores avances en este campo así como para resolver las barreras científicas y tecnológicas.

Según avance la investigación sería necesario contar con instalaciones piloto, que no necesariamente tienen que ser excesivamente grandes, en las que verificar y demostrar los desarrollos, de forma que los datos obtenidos permitan la implantación de la producción de microalgas con fines energéticos a gran escala. En la medida de lo posible, estas instalaciones piloto deberían tener un fácil acceso a puntos de emisión de CO₂ y agua marina y/o residual. La investigación debe permitir el desarrollo de módulos industriales y de sistemas de cultivo escalables que permitan conseguir producciones sostenibles a gran escala.

La producción de biomasa microalgal puede tener diversas aplicaciones, entre otros la alimentación de organismos zooplanctónicos que se emplean as u vez como alimento para larvas de peces y crustáceos. También son usadas en la obtención de algún compuesto químico, para la alimentación humana directa o como complemento proteínico en alimentos balanceados (Díaz, 1987).

-

IV. FASE EXPERIMENTAL

IV.1 Materiales y métodos para la fase experimental I.

Obtención de la cepa. La microalga *Chlorella protothecoides* se obtuvo a partir de un cultivo autotrófico monoalgal del Laboratorio de Corrosión del Instituto Mexicano del Petróleo.

Purificación de la cepa. La cepa de la especie de microalga bajo estudio no estaba totalmente purificada, por lo que se procedió a realizar lo siguiente: se tomo una pequeña fracción líquida del tubo de ensayo (cepa en refrigeración) y se inoculó de forma circular en cajas Petri con Medio Basal de Bold con agar (20 gL^{-1}) para iniciar su crecimiento en placa (Stein, 1973).

Las cajas Petri se colocaron en el sistema de cultivo (caja con lámparas) y se les proporcionó iluminación continua con lámparas fluorescentes “luz de día” (aproximadamente 8,500 luxes) a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) para iniciar su crecimiento multiespecífico (algas y bacterias). Después de dos semanas aproximadamente de crecimiento, se efectuó resiembra de aquellas colonias que presentaran coloración indicativa de crecimiento microalgal empleando para ello asas microbiológicas.

Este segundo grupo de cajas Petri se sometió a las condiciones de iluminación, temperatura y tiempo de crecimiento antes mencionados. Se realizaron varias resiembras hasta obtener la cepa pura. Finalmente, las cajas Petri obtenidas fueron observadas y revisadas al microscopio para verificar que el cultivo fuera monoespecífico.

Preparación de medios. Los medios de cultivo que se evaluaron para el crecimiento de *Chlorella protothecoides* fueron, el Medio Basal de Bold (MBB), Medio Basal de Bold modificado (eliminando la solución 1 (NaNO_3) y adicionando 1 ml/L de una solución estándar de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (2,03 g/L), medio Watanabe a pH=6 y pH=8, medio Watanabe bajo en nitrógeno, medio Basal de Bold y Watanabe con 10 y 20 gL^{-1} de glucosa (como fuente de carbono). Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C , 15 psi y durante 15 minutos.

Cultivo estático en matraz Erlenmeyer de 500 ml. Se seleccionaron las cajas de Petri, en las cuales la cepa ya se encontraba pura, se tomaron algunas colonias aisladas y se sembraron en cada uno de los medios de cultivo antes preparados (matraz Erlenmeyer de 500 ml, con un volumen total de medio de 400 mL).

A cada matraz, se le colocó un tapón de goma con dos tubos de vidrio de diferente tamaño (diámetro interior de 0.5 cm), uno largo de aproximadamente 21 cm de largo y otro de 8 cm respectivamente, previamente esterilizados y bajo condiciones estériles.

Los matraces (como sistemas) fueron colocados en el sistema de cultivo (caja con lámparas). Los cultivos se realizaron bajo condiciones de laboratorio, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, aireación constante, iluminación continua con lámparas fluorescentes “luz de día” (8,500 luxes) y fotoperiodo 12:12 (luz-obscuridad).

Los cultivos fueron alimentados con recambio de cada medio de cultivo preparado y agua destilada estéril, el cual es la forma más común para mejorar la densidad celular y por tanto obtener una mayor cantidad de biomasa microalgal como materia prima.

Las microalgas se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial, que se presentó una vez transcurridos de 9 a 15 días (Moreno-Garrido *et al.*, 2000). Una vez retirados los sistemas, se mantuvieron en refrigeración a 4°C para favorecer la sedimentación celular y enseguida se procedió a decantar el sobrenadante para concentrar las células microalgales. La densidad celular se determinó (alícuota de aproximadamente 15 μl) de cada suspensión de cultivo, con el fin de servir como inóculo para la siguiente fase de cultivo.

Cultivo en matraz Erlenmeyer de 1000 ml. Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de $1,00 \times 10^5$ cel mL^{-1} conteniendo cada uno de los matraces, 800 mL de medio de cultivo antes preparados. El tipo de sistema que fue utilizado fue, el semicontinuo con recambios de medio de cultivo y agua destilada estéril cada tercer o quinto día del 20 al 30% del volumen, con el fin de mejorar la densidad celular. Nuevamente a cada matraz, se le colocó un tapón de goma con dos tubos de vidrio de diferente tamaño, previamente esterilizados y bajo condiciones estériles.

Los matraces fueron (como sistema) colocados en el sistema de cultivo (caja con lámparas), aireados constantemente utilizando aire comprimido, con el fin de favorecer la disponibilidad de nutrientes, homogenización y exposición de luz a todo el cultivo celular. Los cultivos se realizaron bajo condiciones de laboratorio, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, aireación constante, iluminación continua con lámparas fluorescentes “luz de día” (8,500 luxes) y fotoperiodo 12:12 (luz-obscuridad).

Determinación de la densidad celular (células/ml). La densidad celular se determinó tomando diariamente de cada uno de los matraces de 1000 mL, una alícuota (aproximadamente 15 μl) de la suspensión de microalgas. Los recuentos se realizaron con una cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad y un microscopio marca Meiji, modelo 2000 cada tercer día hasta alcanzar la fase estacionaria.

IV.2 Materiales y métodos para la fase experimental II.

Los sistemas de cultivo de microalgas actualmente presentan ciertas limitantes tales como: la escasez de información para su escalamiento, la dificultad para el mantenimiento de monocultivos, los elevados costos de operación para la producción y recolección de la biomasa producida. Por lo que, las investigaciones concernientes al cultivo de microalgas no han tenido gran alcance, por eso se hace necesaria la realización de este estudio más elaborado para obtener de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*, información que nos permita conocer su comportamiento de crecimiento a nivel de escalamiento (Garibay *et al.*, 2009).

Después de seleccionar el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *Chlorella protothecoides*, se evaluaron las cinéticas de crecimiento a nivel escalamiento de las dos microalgas bajo estudio.

Escalamiento del cultivo. El escalamiento de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*, involucra el cultivo estático desde tubo de ensayo hasta la producción masiva (carboy) en un garrafón de vidrio de 20 litros de capacidad. En la figura 3 y 4, se muestran esquemáticamente los resultados obtenidos del escalamiento del crecimiento de las microalgas.

Obtención de las cepas. Las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* se obtuvieron como se menciona anteriormente, de un cultivo autotrófico monoalgal del Laboratorio de corrosión microbiológica del Instituto Mexicano del Petróleo.

Purificación de las cepas. Las cepas de las especies de microalgas bajo estudio, se tuvieron que volver a purificar, debido a que las cepas originales se contaminaron, por lo que se procedió nuevamente para cada especie a realizar lo siguiente: Se tomo una pequeña fracción líquida del tubo de ensayo y se inoculó de forma circular en cajas Petri con Medio Basal de Bold con agar (20 gL^{-1}) para iniciar su crecimiento en placa (Stein, 1973).

Se proporcionó iluminación continua con lámparas fluorescentes “luz de día” (aproximadamente 8,500 luxes) a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) para iniciar su crecimiento multiespecífico (algas y bacterias). Después de dos semanas (aproximadamente) de crecimiento, se efectuó resiembra en aquellas colonias que presentaron coloración indicativa de crecimiento microalgal empleando para ello aspas microbiológicas.

Este segundo grupo de cajas Petri se sometió a las condiciones de iluminación, temperatura y tiempo de crecimiento antes mencionados. Se realizaron varias resiembras hasta obtener las cepas puras.

Cultivo en tubo de ensayo. Finalmente de las cajas Petri obtenidas, se observó al microscopio para verificar que cada uno de los cultivos fuera monoespecífico, inoculando a *Chlorella vulgaris* en medio Bold Basal y a *Chlorella protothecoides* en medio Bold Basal modificado, con el propósito de producir a cada una de las especies en un medio líquido y dar inicio a su producción masiva a pequeña escala.

Cultivo estático en matraz Erlenmeyer de 100 ml. Del crecimiento de cada uno de los tubos de ensayo, se tomó una alícuota (aproximadamente 1 ml) y se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con medio de cultivo antes mencionado para cada una de las especies de microalgas. Los cultivos fueron mantenidos bajos las condiciones de iluminación y temperatura antes mencionadas.

Cultivo estático en matraz Erlenmeyer de 500 ml. Se tomo una alícuota (aproximadamente 1 ml) de cada uno de los matraces de 100 ml y se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Los cultivos fueron mantenidos bajos las condiciones de iluminación y temperatura antes mencionadas.

Cultivo en matraz Erlenmeyer de 1000 ml. Se emplearon para cada especie de microalga, un matraz Erlenmeyer de la misma capacidad e inoculados cada uno con la misma concentración celular, con el fin de obtener biomasa microalgal.

Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹ conteniendo cada uno de los matraces, 800 mL de medio de cultivo antes mencionados para cada especie de microalga, antes los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C, 15 psi y durante 15 minutos. Los cultivos se realizaron bajo condiciones autótrofas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, aireación constante, iluminación continua (8500 luxes) y fotoperiodo 12:12 (luz-obscuridad). El tipo de sistema que fue utilizado fue, el semicontinuo con recambios de medio de cultivo y agua destilada estéril cada tercer o quinto día del 20 al 30% del volumen. Esta es la forma más común para mejorar la densidad celular y por tanto obtener una mayor cantidad de biomasa microalgal como materia prima.

Las microalgas se cosecharon en la fase de crecimiento exponencial (Moreno-Garrido *et al.*, 2000).

Cultivo en garrafón (carboy) de 20 litros. Se prepararon 16 litros de medio Basal de Bold (MBB) y medio Basal de Bold modificado en matraces Kitasato de 3000 ml, se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 psi y durante 15 minutos.

Los garrafones de vidrio primeramente fueron lavados con jabón, enjuagado con agua de la llave y finalmente con agua destilada. Posteriormente fueron esterilizados con luz ultravioleta por dos horas en una campana de flujo laminar.

Finalmente, bajo condiciones asépticas y con ayuda de mecheros, los garrafones fueron llenados con cada uno de los medios preparados hasta 15 litros de prueba, inmediatamente a cada uno de los garrafones se les colocó un tapón de goma con los tubos de aireación (previamente esterilizados).

De un segundo matraz Erlenmeyer de 1000 ml de capacidad, crecido bajo las mismas condiciones para cada una de las especies de microalgas, se centrifugó con el propósito de concentrar la biomasa y utilizarla para inocular cada uno de los garrafones (carboy) así como para determinar la cantidad de biomasa producida. Cada uno de los garrafones se inoculó con una densidad celular de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹.

Parámetros fisicoquímicos evaluados. La densidad celular se determinó tomando diariamente de cada uno de los matraces de 1000 ml y de los garrafones (carboy) durante el periodo de ensayo, una alícuota (aproximadamente 15 µl) de la suspensión de microalgas.

Se determinó el potencial de hidrógeno (pH), temperatura (°C) y sólidos totales (ST) de acuerdo al Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1992) cada tercer día.

Equipos empleados. Para la temperatura y el potencial de hidrógeno se empleó un potenciómetro marca Oakton, modelo TDS 510. Los recuentos se realizaron con una cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad y un microscopio marca Meiji, modelo 2000. Para la estimación de la biomasa microalgal se utilizó una mufla marca Blue M.

IV.3 Materiales y métodos para la fase experimental III

Obtención y purificación de las cepas. Como anteriormente se llevó a cabo la fase experimental II, la cepa de cada especie de microalga se encontraba aislada y pura. Por lo que, para esta fase experimental no hubo necesidad de aislar y purificar las cepas de microalgas bajo estudio.

Para el desarrollo de esta fase experimental, se inició con un cultivo estático en un matraz de 2000 mL para cada especie de microalga, los cuales fueron utilizados para inocular los matraces de 1000 mL y los garrafones de 20 litros de capacidad (carboys). Los matraces fueron cosechados en la fase de crecimiento exponencial (Moreno-Garrido *et al.*, 2000). Una vez retirados, se mantuvieron en refrigeración a 4°C para favorecer la sedimentación celular y enseguida se procedió a decantar el sobrenadante para concentrar las células microalgales. La densidad celular se determinó (alícuota de aproximadamente 15 µl) de cada suspensión de cultivo en una cámara de Neubauer, con el fin de servir como inóculo.

Se utilizaron las microalgas provenientes de la familia *Chlorophyceae* (*Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*). Además *Chlorella vulgaris* fue seleccionada porque es una de las microalgas más utilizada en la industria, se tiene mayor experiencia en su cultivo, se conoce más sobre su composición bioquímica y sobre la extracción de su aceite.

En esta fase experimental, la evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* se llevo por triplicado en matraces Erlenmeyer de 1000 mL (Figura 9) y en garrafones de 20 litros de capacidad (carboys) para *Chlorella protothecoides* y *Chlorella vulgaris*.

Preparación de medios. El medio de cultivo que se evaluó para el crecimiento de *Chlorella vulgaris* fue el Medio Basal de Bold (MBB), mientras que para *Chlorella protothecoides* fue el Medio Basal de Bold modificado (eliminando la solución 1 (NaNO_3) y adicionando 1 ml/L de una solución estándar de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($2,03 \text{ gL}^{-1}$). Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C , 15 psi y durante 15 minutos.

Cultivo en matraz Erlenmeyer de 1000 ml. En esta fase experimental, se evaluó por triplicado (sistema 1, 2 y 3) el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*, empleando para ello tres matraces Erlenmeyer de 1000 mL de capacidad, conteniendo cada uno de los matraces 750 mL de medio de cultivo previamente esterilizados en autoclave a 121°C , 15 psi y durante 15 minutos. Los sistemas fueron inoculados con la misma concentración celular, con el fin de obtener una producción de biomasa microalgal similar. Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de $5,00 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$ bajo condiciones de laboratorio y autótrofas.

A cada matraz, se le colocó un tapón de goma con dos tubos de vidrio de diferente tamaño (diámetro interior de 0.5 cm), uno largo de aproximadamente 21 cm de largo y otro de 8 cm respectivamente, previamente esterilizados y bajo condiciones estériles. Finalmente los matraces (como sistemas) fueron colocados en el sistema de cultivo (caja con lámparas), aireados constantemente utilizando aire comprimido, con el fin de favorecer la disponibilidad de nutrientes, homogenización y exposición de luz a todo el cultivo celular.

Cultivo en garrafón (carboy) de 20 litros. Se prepararon 16 litros de medio Basal de Bold (MBB) y medio Basal de Bold modificado en matraces Kitasato de 3000 ml, se esterilizaron en autoclave a 121°C , 15 psi y durante 15 minutos.

Los garrafones de vidrio primeramente fueron lavados con jabón, enjuagado con agua de la llave y finalmente con agua destilada. Posteriormente fueron esterilizados con luz ultravioleta por dos horas en una campana de flujo laminar.

Finalmente, bajo condiciones asépticas y con ayuda de mecheros, los garrafones fueron llenados con cada uno de los medios preparados hasta 15 litros de prueba, inmediatamente a cada uno de los garrafones se les colocó un tapón de goma con los tubos de aireación (previamente esterilizados).

Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹ bajo condiciones de laboratorio y autótrofas.

Condiciones de cultivo. Para los sistemas 1,2 y 3 (matraz Erlenmeyer de 1000 mL, se proporcionó una temperatura de 25°C, aireación constante, iluminación continua (8500 luxes) y fotoperiodo 12:12 (luz-obscuridad) mientras que para los sistemas carboy por triplicado se proporcionó una temperatura de 26 a 28°C, aireación constante, iluminación continua (1,200 luxes) y fotoperiodo 12:12 (luz-obscuridad). El tipo de sistema que fueron utilizados fue, el semicontinuo con recambios de medio de cultivo y agua destilada estéril cada cinco días del 20 al 30% del volumen. Esta es la forma más común para mejorar la densidad celular y por tanto obtener una mayor cantidad de biomasa microalgal como materia prima

En esta fase experimental, se realizaron algunas mejoras en el sistema de cultivo (rack de crecimiento de microalgas) antes de iniciar el crecimiento de las microalgas bajo estudio (carboy), debido a que en el momento de la realización del experimento nos encontrábamos en la temporada de lluvias (junio a agosto) por lo que las variaciones de temperatura en el laboratorio eran cruciales. Por lo anterior, a los carboys se les colocó una cinta de calentamiento conectado a la vez a un reóstato para controlar la temperatura. La temperatura durante esta fase de experimentación se mantuvo a una temperatura de 26 a 28°C.

Además al rack de crecimiento, se le instalaron seis lámparas de luz blanca y un cajón con cuatro lámparas, con la finalidad de aumentar la intensidad luminosa en el sistema, alcanzando una iluminación continua de 1,200 luxes. Finalmente cuando la fase experimental se inició, se cubrió al rack de crecimiento con papel Craft, el cual en una de sus caras se encontraba forrado con papel aluminio, esto con la finalidad de favorecer la incidencia y reflejo de la luz blanca.

Obtención de biomasa. Las microalgas se cosecharon cuando alcanzaron la fase estacionaria (Moreno-Garrido *et al.*, 2000). Una vez cosechada la biomasa microalgal de cada sistema (matraz de 1000 mL), se mantuvieron en refrigeración a 4°C para favorecer la sedimentación celular. Enseguida se procedió a decantar el sobrenadante para concentrar las células microalgales.

El laboratorio no cuenta con un refrigerador de gran tamaño, por lo que los garrafones (carboy) fueron colocados en un lugar sin luz y en donde nadie pudiera moverlos, con el fin de favorecer la sedimentación natural.

Finalmente el sobrenadante de cada uno de los sistemas (carboy), fue retirado con ayuda de un tubo de vidrio con manguera, con el objetivo de recuperar el concentrado microalgal.

Secado de la biomasa obtenida. La pasta húmeda de cada sistema (1000 mL y carboy), se transfirió a una cápsula de porcelana grande, colocándose en una estufa a 50 – 60°C durante aproximadamente 15 horas. Después de secar cada muestra, esta fue raspada de la cápsula de porcelana con ayuda de una espátula, con el fin de recuperar la biomasa producida de cada sistema. Finalmente, la pasta seca se maceró hasta obtener la biomasa fina y pesada en una balanza analítica.

Ácidos grasos (átomos de carbono): Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard GC System modelo 6890 con inyector de columna, columna de 10 metros y detector (FID) de flama ionizada, de acuerdo al método ASTM-2887.

Parámetros fisicoquímicos evaluados. La densidad celular se determino tomando diariamente de cada uno de los matraces de 1000 ml y de los garrafones (carboy) durante el periodo de ensayo, una alícuota (aproximadamente 15 μ l) de la suspensión de microalgas.

Se determino el potencial de hidrógeno (pH), temperatura (°C), sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), sólidos fijos (SF) y sólidos suspendidos totales (SST) de acuerdo al Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1992) cada tercer día.

Equipos empleados. Para la temperatura se empleó un termómetro de infrarrojo marca Cole Parmer modelo 39800, para medir el potencial de hidrógeno se empleó un potenciómetro marca Oakton, modelo TDS 510. Los recuentos se realizaron con una cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad y un microscopio marca Meiji, modelo 2000. Para la estimación de la biomasa microalgal se utilizó una mufla marca Blue My una balanza analítica marca Scaltec.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Resultados y discusión para la fase experimental I.

En la Figura 1, se representa esquemáticamente los sistemas de cultivo utilizados durante la fase experimental para la microalga *Chlorella protothecoides* en los diferentes medios de cultivo preparados.

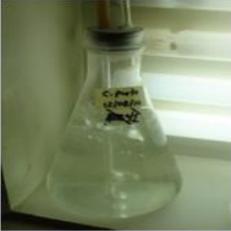
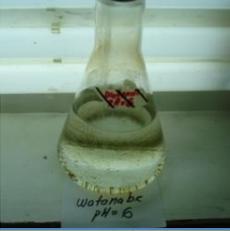
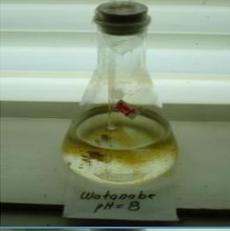
MEDIO DE CULTIVO	INOCULACIÓN	CRECIMIENTO
Medio Bold Basal (MBB)		
Medio Bold Basal (MBB) modificado		
Watanabe pH= 6		
Watanabe pH= 8		
Watanabe bajo en nitrógeno		



Figura 1. Representación esquemática de los diferentes medios de cultivos utilizados para el crecimiento de la microalga *Chlorella protothecoides*.

V.1.1 Medios de cultivo evaluados para el cultivo de *Chlorella protothecoides*.

Con respecto a los seis medios de cultivos evaluados (medio Watanabe a pH de 6 y 8, medio Basal de Bold y Watanabe con 10 y 20 gL⁻¹ de glucosa) para el crecimiento de *Chlorella protothecoides*, no se obtuvieron resultados satisfactorios, debido a que en ninguno de los medios existió un crecimiento adecuado. Los resultados mostraron que al esterilizar el medio de cultivo Watanabe a pH de 6 y 8 se forma un precipitado de hierro, no favoreciendo el crecimiento de la misma. Con respecto a los medios MBB y Watanabe con 10 y 20 gL⁻¹ de glucosa, inicialmente se observó que la microalga bajo estudio comienza a crecer pero con el transcurso de los días comienza a presentarse una contaminación del medio por bacterias, tornándose blanquecino (turbio).

En este trabajo de investigación se esperaba que se obtuvieran resultados parecidos a los realizados por otros autores, al utilizar a la microalga *Chlorella protothecoides* bajo condiciones de laboratorio y heterótrofas.

Mia y Wo (2004) reportaron que con la adición de glucosa al medio de cultivo como fuente de carbono y disminución de nitrógeno inorgánico bajo condiciones heterotróficas, el contenido de lípidos en las células es cuatro veces mayor que bajo condiciones autótrofas.

Mia y Wo (2006) reportan que el crecimiento heterotrófico (10 gL⁻¹ de glucosa) de *C. protothecoides* ha resultado en una alta producción de biomasa y una mayor acumulación de lípidos en las células. Además realizaron un estudio con *C. protothecoides* para obtener una alta producción de biomasa y obtención de biodiesel en un fermentador. Los resultados mostraron que la densidad celular aumenta significativamente, alcanzando una concentración celular de 15,5 gL⁻¹.

Li *et al.* (2007) mostró que es factible el crecimiento de la microalga *C. protothecoides* en un bioreactor a escala comercial bajo condiciones heterótrofas y usando 75% de lipasa inmovilizada. Así mismo, utilizó a *Chlorella protothecoides* bajo condiciones heterotróficas en bioreactores de 5 L, 750 L y 11,000 litros,

alcanzando densidades celulares de $15,5 \text{ gL}^{-1}$ en 5L; $12,8 \text{ gL}^{-1}$ en 750 L y de $14,2 \text{ gL}^{-1}$ en 11,000 litros.

Wei *et al.* (2008) evaluó el crecimiento de *C. protothecoides* heterotróficamente, adicionando al medio basal diferentes fuentes de nitrógeno.

En los medios de cultivo (MBB, MBB modificado y Watanabe bajo en nitrógeno), se presentó una tendencia similar de crecimiento, observándose las fases características de un cultivo discontinuo (fase de latencia, exponencial o logarítmica y estacionaria) (Figura 2). Todos los cultivos se estabilizaron a tres días antes de iniciar el programa de monitoreo. La fase de latencia o adaptación fue de 1 día con una densidad celular de $8,90 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$ (MBB), de 5 días con $5,05 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ (MBB modificado) y de 6 días con $9,13 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$ en medio Watanabe bajo en nitrógeno, respectivamente.

La fase exponencial duró 16 días con $3,94 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ (MBB), 29 días con $9,48 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ (MBB modificado) y de 28 días con $3,00 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ (Watanabe bajo en nitrógeno). Finalmente la fase estacionaria se presentó después de los 16 a 21 días con una densidad promedio de $3,90 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ (MBB), 30 días con $9,48 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ (MBB modificado) y de 29 días con una densidad de $2,96 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ (Watanabe bajo en nitrógeno) (Figura 2).

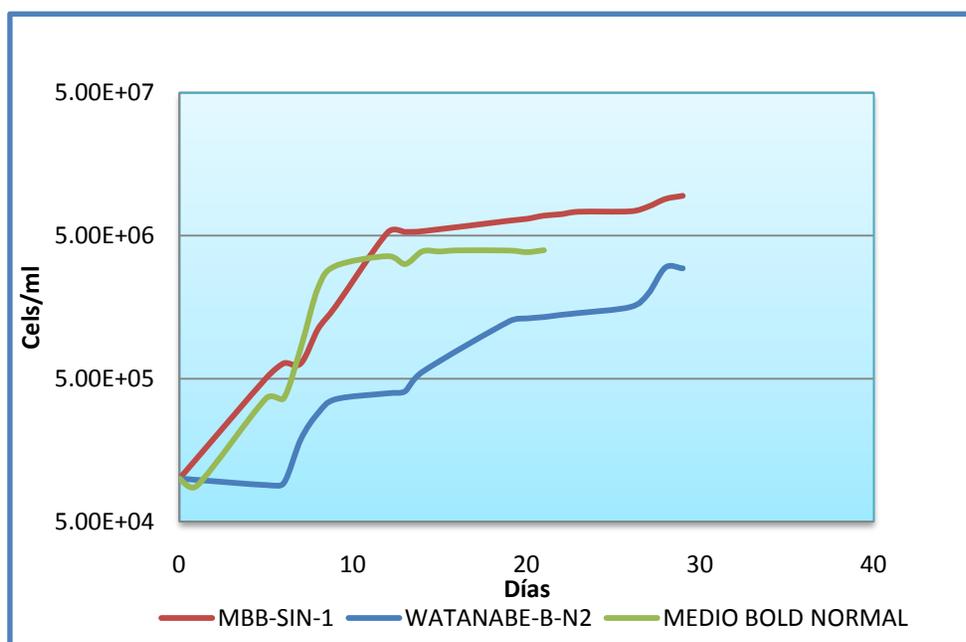


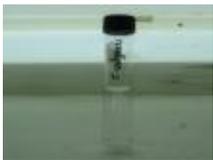
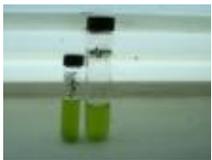
Figura 2. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella protothecoides* en tres diferentes medios de cultivo.

Después de analizar los resultados obtenidos de la fase experimental, utilizando tres medios de cultivo para el crecimiento de *Chlorella protothecoides*, se encontró que el medio Basal de Bold modificado es el más apropiado para el cultivo de la microalga bajo estudio respecto a los demás medios de cultivos evaluados y bajo las condiciones experimentales trabajadas.

Por lo que para la siguiente fase experimental, el medio de cultivo utilizado para el escalamiento de la microalga *Chlorella protothecoides* será el medio de cultivo Basal de Bold modificado.

V.2 Resultados y discusión para la fase experimental II.

En las Figuras 3 y 4, se representan esquemáticamente el escalamiento del cultivo para cada una de las especies de microalgas evaluadas.

ETAPA	INOCULACIÓN	CRECIMIENTO
Purificación de la cepa		
Cultivo en tubo de ensayo		
Cultivo estático en matraz Erlenmeyer de 100 ml		
Cultivo en matraz Erlenmeyer de 500 ml		
Cultivo en matraz Erlenmeyer de 1000 ml		

Cultivo en garrafón (carboy) de 20 litros		
Obtención de biomasa		

Figura 3. Representación esquemática del escalamiento del cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*.

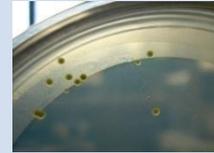
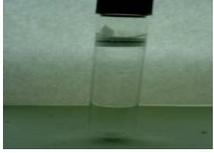
ETAPA	INOCULACIÓN	CRECIMIENTO
Purificación de la cepa		
Cultivo en tubo de ensayo		
Cultivo estático en matraz Erlenmeyer de 100 ml		
Cultivo en matraz Erlenmeyer de 500 ml		
Cultivo en matraz Erlenmeyer de 1000 ml		
Cultivo en garrafón (carboy) de 20 litros		



Figura 4. Representación esquemática del escalamiento del cultivo de la microalga *Chlorella protothecoides*.

V.2.1 *Chlorella protothecoides* matraz de 1000 mL y garrafón de 20 litros (carboy).

Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹ (matraz) y de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹ (garrafón). El crecimiento de la microalga también presentó una tendencia similar tanto en el matraz como en el garrafón, con una fase de latencia o adaptación que culminó el día 7 con una densidad celular de $5,95 \times 10^5$ cel mL⁻¹ (matraz) y de $1,42 \times 10^5$ cel mL⁻¹ en el día 3 (garrafón); la fase exponencial o logarítmica duró 29 días con una densidad celular de $9,48 \times 10^6$ cel mL⁻¹ (matraz) y de $1,10 \times 10^6$ cel mL⁻¹ de 16 días (garrafón). Finalmente la fase estacionaria se presentó después de los 30 días con una densidad celular de $9,42 \times 10^6$ cel mL⁻¹ (matraz) y de $2,80 \times 10^6$ cel mL⁻¹ a partir del día 24 (garrafón) (Figura 5 y 6).

En la tabla 5, se muestra el resumen de las densidades celulares obtenidas para cada fase de crecimiento en los dos sistemas evaluados (matraz y carboy) para la microalga *Chlorella protothecoides*.

Tabla 5. Densidades celulares obtenidas para los dos sistemas evaluados (matraz y carboy) para la microalga *Chlorella protothecoides*.

Fases de crecimiento en sistema matraz y carboy para <i>Chlorella protothecoides</i>						
Sistema	Latencia o adaptación		Exponencial o logarítmica		Estacionaria	
	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)
Matraz	7	$5,95 \times 10^5$	29	$9,48 \times 10^6$	30	$9,42 \times 10^6$
Carboy	3	$1,42 \times 10^5$	16	$1,10 \times 10^6$	24	$2,80 \times 10^6$

* Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹ en ambos sistemas.

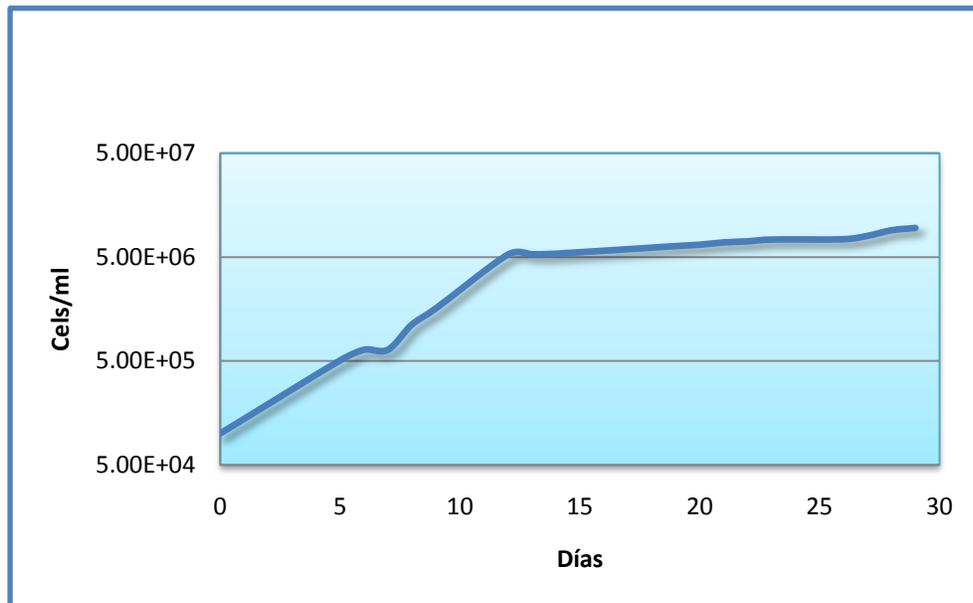


Figura 5. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella protothecoides* en medio Bold Basal modificado (matraz Erlenmeyer de 1000 ml) durante la fase de experimentación.

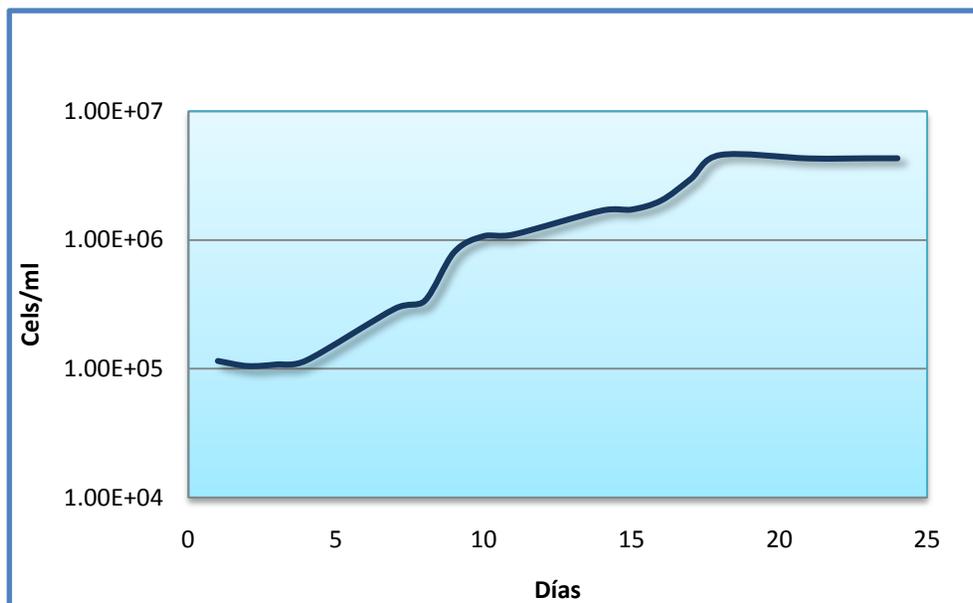


Figura 6. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella protothecoides* en el garrafón de vidrio de 20 litros de capacidad (Carboy).

V.2.2 *Chlorella vulgaris* matraz de 1000 mL y garrafón de 20 litros (carboy).

Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de $5,00 \times 10^4$ cel mL⁻¹ (matraz) y de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹ (garrafón). El crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* presentó una tendencia similar de crecimiento tanto en el matraz como en el garrafón, presentando las fases características de un cultivo discontinuo, con una fase de latencia o adaptación que culminó el día 2 con una densidad celular de $5,28 \times 10^5$ cel mL⁻¹ (matraz) y de $1,16 \times 10^5$ cel mL⁻¹ en el día 4 (garrafón); la fase exponencial o logarítmica duró 13 días con una densidad celular de $2,50 \times 10^7$ cel mL⁻¹ (matraz) y $1,11 \times 10^7$ cel mL⁻¹ de 33 días (garrafón). Finalmente la fase estacionaria se presentó después de los 14 a 18 días con una densidad celular de $2,12 \times 10^7$ cel mL⁻¹ (matraz) y de $1,09 \times 10^7$ cel mL⁻¹ después de los 38 días (garrafón) (Figura 7 y 8). Estos valores están ligeramente por arriba de los reportados para *Chlorella vulgaris* (6×10^6 cel mL⁻¹) para un volumen de 2 L (Tama & Wong, 1996; Illman *et al.*, 2000).

En la tabla 6, se muestra el resumen de las densidades celulares obtenidas para cada fase de crecimiento en los dos sistemas evaluados (matraz y carboy) para la microalga *Chlorella vulgaris*.

Tabla 6. Densidades celulares obtenidas para los dos sistemas evaluados (matraz y carboy) para la microalga *Chlorella vulgaris*.

Fases de crecimiento en sistema matraz y carboy para <i>Chlorella vulgaris</i>						
Sistema	Latencia o adaptación		Exponencial o logarítmica		Estacionaria	
	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)
Matraz	2	$5,28 \times 10^5$	13	$2,50 \times 10^7$	14-18	$2,12 \times 10^7$
Carboy	4	$1,16 \times 10^5$	33	$1,11 \times 10^7$	38	$1,09 \times 10^7$

* El sistema (matraz 1000 mL) se inicio con una densidad celular de $5,00 \times 10^4$ cel mL⁻¹ y de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹ para *Chlorella vulgaris*.

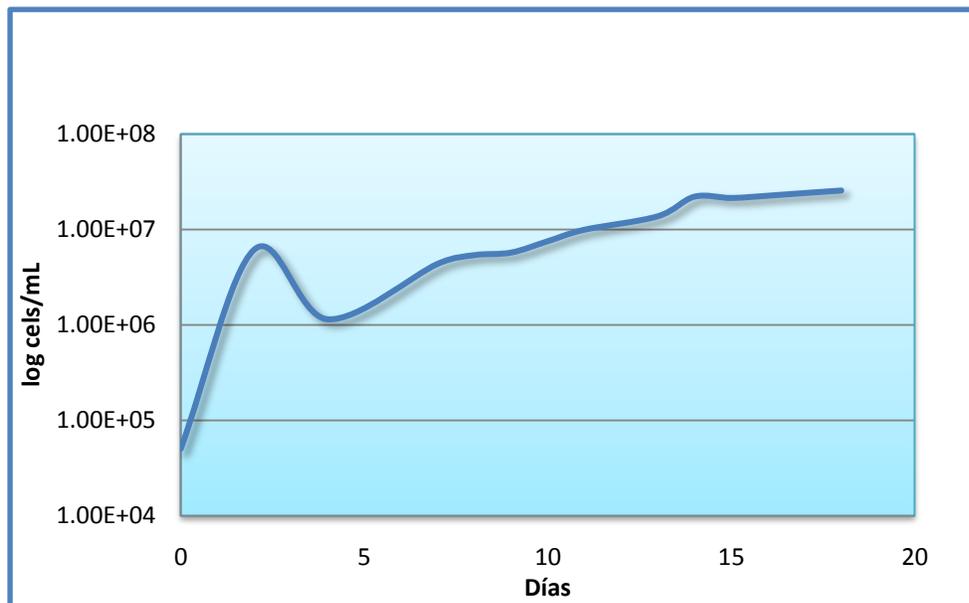


Figura 7. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en medio Bold Basal (matraz Erlenmeyer de 1000 mL) durante la fase de experimentación.

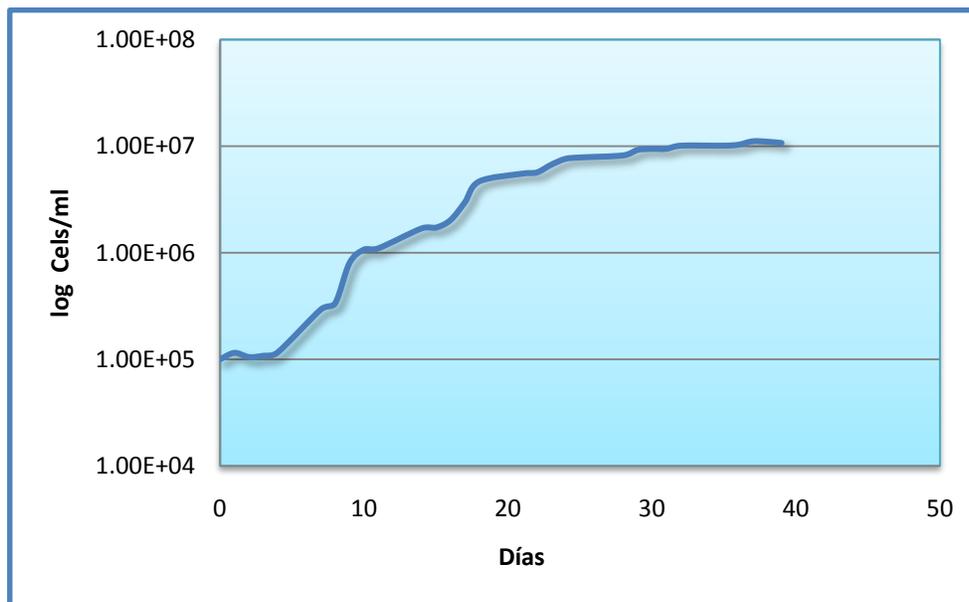


Figura 8. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en medio Bold Basal (carboy) durante la fase de experimentación.

Existen trabajos relacionados con el cultivo de *Chlorella vulgaris* en fotobioreactores, utilizando los medios de cultivo (N-8, M-8 modificado, N-8 complementado con KNO_3 y N-8 complementado con MgSO_4 y N-8 complementado con FeSO_4 bajo condiciones autótrofas, alcanzando densidades celulares de 5×10^9 cel mL^{-1} . Además de mostrar un incremento continuo en el contenido de clorofila y biomasa durante el periodo de experimentación (Mandalam & Palsson, 1998).

En otro trabajo de investigación, se evaluaron e identificaron el medio de cultivo en el que *Chlorella vulgaris* crece con mayor rapidez. Los medios evaluados fueron medio Basal de Bold (MBB), Chu No. 10 y solución nutritiva Knop, obteniendo como resultado un mayor crecimiento en el medio MBB con una velocidad de crecimiento de 0.51 divisiones por día (Abalde *et al.*, 1995; González *et al.*, 1999).

Valdés (1994) evaluó el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en tres medios de cultivo (medio Basal de Bold como testigo, biabonos líquidos de vaca y borrego). Los resultados obtenidos mostraron que se alcanzan concentraciones celulares similares en los tres tratamientos, registrándose una densidad celular de 1.65×10^6 cel mL^{-1} en el medio MBB, $14,9 \times 10^6$ cel mL^{-1} en biabono líquido de borrego y de $14,35 \times 10^6$ cel mL^{-1} en el biabono líquido de vaca.

Illman *et al.* (2000) evaluó el crecimiento de cinco cepas de *Chlorella* (*C. vulgaris*, *C. emersonii*, *C. protothecoides*, *C. sorokiniana* y *C. minutissima*) en medio Watanabe y medio bajo en nitrógeno en bioreactores de dos litros, reportando que *C. vulgaris* presenta un mejor crecimiento con una tasa de crecimiento de 0.99 d^{-1} .

Scragg *et al.* (2002) reportó el crecimiento de *C. vulgaris* y *C. emersonii* en medio Watanabe y medio bajo en nitrógeno en un fotobioreactor tubular de 230 litros, reportando que en el medio bajo en nitrógeno existe una alta acumulación de lípidos en ambas microalgas.

Correa *et al.* (2003) evaluaron algunos medios (MBB y CHU) de cultivo para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, concluyendo que el medio MBB es el óptimo para el crecimiento de la microalga.

En otros estudios se ha utilizado a *Chlorella vulgaris* para conocer su composición bioquímica, las características del perfil aminoacídico, la producción de biomasa y su calidad proteica, cultivada en régimen autotrófico (Morris *et al.*, 1999; Ortega *et al.*, 2004).

Aguirre *et al.* (2007) evaluaron el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* ante diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo, a través de ensayos de bioestimulación en una cámara ambiental.

Sarma *et al.* (2008) reportó el crecimiento de *C. vulgaris* en medio basal de Bold enriquecido con 0.5 gL^{-1} de bicarbonato de sodio en sistemas de dos litros.

El valor inicial promedio de pH en todos los sistemas fue de 6.60 ± 0.01 a 6.622 ± 0.0006 unidades, incrementándose durante el transcurso de los días hasta un pH promedio de 7.32 ± 0.006 a 8.88 ± 0.02 .

De acuerdo con los registros de temperatura obtenidos se detectó que ésta inicia a 25°C , incrementándose durante el transcurso de los días hasta $27 \pm 2^\circ\text{C}$ con pequeñas variaciones. Esta variación, se debió probablemente a la influencia de las oscilaciones de la temperatura ambiental ya que no se cuenta con una temperatura controlada en el laboratorio y ésta también depende de la época del año.

En los sistemas evaluados (matraz Erlenmeyer de 1000 ml y carboy), existió un aumento en los ST durante toda la fase experimental, debido a que a través del transcurso de los días, hay una mayor producción de biomasa. Esta producción de biomasa es más evidente en el cultivo de *Chlorella vulgaris* en comparación con *Chlorella protothecoides*.

En otros estudios se ha utilizado a *Chlorella vulgaris* para conocer su composición bioquímica, las características del perfil aminoacídico, la producción de biomasa y su calidad proteica, cultivada en régimen autotrófico (Morris *et al.*, 1999; Ortega *et al.*, 2004).

Después de que los sistemas (matraz Erlenmeyer de 1000 ml y carboy), alcanzaron la fase estacionaria, fueron retirados. La biomasa producida en cada uno de los sistemas, se centrifugó y la pasta húmeda se transfirió a una cápsula de porcelana, colocándose en una estufa a $50 - 60^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 15 horas, luego la pasta seca se maceró hasta obtener la biomasa seca y finalmente se pesó en una balanza analítica.

La producción de biomasa seca obtenida para *C. vulgaris* en el matraz de 1000 ml fue de $0,33 \text{ gL}^{-1}$. En el nivel carboy o garrafón se obtuvo una producción de biomasa seca de aproximadamente $4,5 \text{ g/15L}$. Existe una tendencia similar de la biomasa seca obtenida en otro trabajo, reportando 0.41 gL^{-1} de biomasa con una densidad celular de $6 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ durante la fase de crecimiento (14 días). En este estudio la biomasa fue menor, probablemente debido al método de obtención y secado de la misma (Illman *et al.*, 2000).

Para *Chlorella protothecoides*, la biomasa seca obtenida fue de 0.057 gL^{-1} en el matraz de 1000 mL, mientras que en nivel carboy la producción de biomasa seca fue de $1,06 \text{ g/15L}$. El comportamiento de la obtención de biomasa es mucho menor comparado con el obtenido con *Chlorella vulgaris*.

Las pruebas de producción de biomasa con estas microalgas bajo estudio, son rápidas y económicas cuando se realizan en pruebas a pequeña escala, por ello son frecuentemente usadas en diferentes estudios experimentales y son aplicadas en un número diferente de contextos (Eisentraeger *et al.*, 2003).

Finalmente, los resultados del estudio del comportamiento de crecimiento de las dos microalga (*Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*) bajo estudio y a nivel de escalamiento, mostraron que estas crecen satisfactoriamente en cada medio de cultivo probado, así como bajo las condiciones de experimentación establecidas bajo laboratorio y bajo condiciones autótrofas.

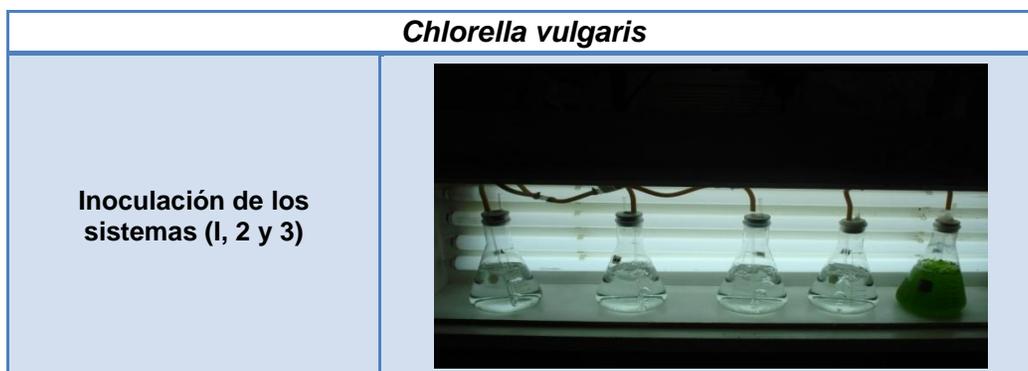
Debido a lo anterior, la aportación de este trabajo de investigación es proporcionar al lector, información que le permita entender y conocer más sobre el comportamiento de crecimiento a nivel de escalamiento de dos microalgas bajo condiciones de laboratorio.

Finalmente en este proyecto de investigación, se propone una tercera fase experimental, con el objetivo de estandarizar el método de cultivo de las dos especies de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*) a nivel masivo para la producción de biomasa y obtención de aceites.

V.3 Resultados y discusión para la fase experimental III.

V.3.1 *Chlorella vulgaris* matraces de 1000 mL.

En la figura 9, se representa esquemáticamente el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* por triplicado (sistemas 1, 2 y 3).



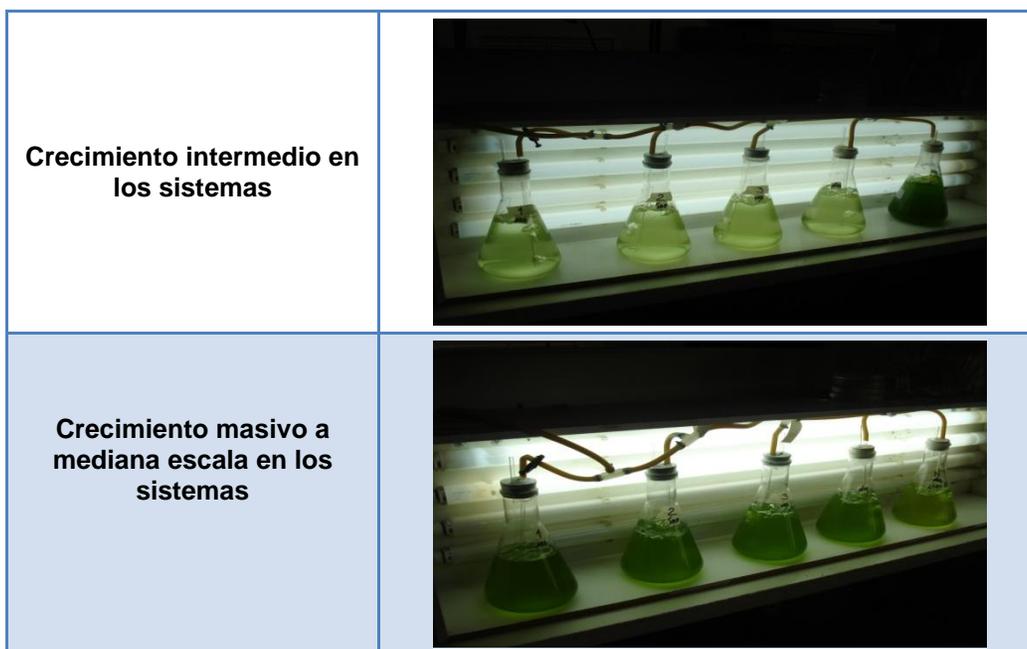


Figura 9. Representación esquemáticamente del crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en el sistema de cultivo.

Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de $5,00 \times 10^4$ cel mL⁻¹. El crecimiento de *Chlorella vulgaris* presentó una tendencia similar en los tres sistemas evaluados, con una fase de latencia que culminó el día 2 con una densidad celular de $6,13 \times 10^6$ (sistema 1); $7,19 \times 10^4$ (sistema 2) y de $5,28 \times 10^5$ cel mL⁻¹ (sistema 3). La fase exponencial que duró 14 días para el sistema 1 ($2,20 \times 10^7$), 13 días para el sistema 2 ($3,14 \times 10^7$) y 13 días para el sistema 3 ($2,50 \times 10^7$ cel mL⁻¹), respectivamente. Finalmente la microalga presentó una fase estacionaria en el sistema 1 después de los 15 días ($2,33 \times 10^7$) y de 14 a 18 días en los sistemas 2 ($2,52 \times 10^7$) y 3 ($2,12 \times 10^7$ cel mL⁻¹) (Figura 10).

En la tabla 7, se muestra el resumen de las densidades celulares obtenidas para cada fase de crecimiento en cada uno de los sistemas (matraz Erlenmeyer de 1000 mL) para la microalga *Chlorella vulgaris*.

Tabla 7. Densidades celulares obtenidas para los sistemas evaluados por triplicado (matraz Erlenmeyer de 1000 mL) para la microalga *Chlorella vulgaris*.

Fases de crecimiento en los sistemas (matraz de 1000 mL) para <i>Chlorella vulgaris</i>						
Sistema	Latencia o adaptación		Exponencial o logarítmica		Estacionaria	
	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)
Matraz 1	2	6,13 X 10 ⁶	14	2,20 X 10 ⁷	15-18	2,33 X 10 ⁷
Matraz 2	2	7,19 X 10 ⁴	13	3,14 X 10 ⁷	14-18	2,52 X 10 ⁷
Matraz 3	2	5,28 X 10 ⁵	13	2,50 X 10 ⁷	14-18	2,12 X 10 ⁷

* Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de 5,00 X 10⁴ cel mL⁻¹ en ambos sistemas.

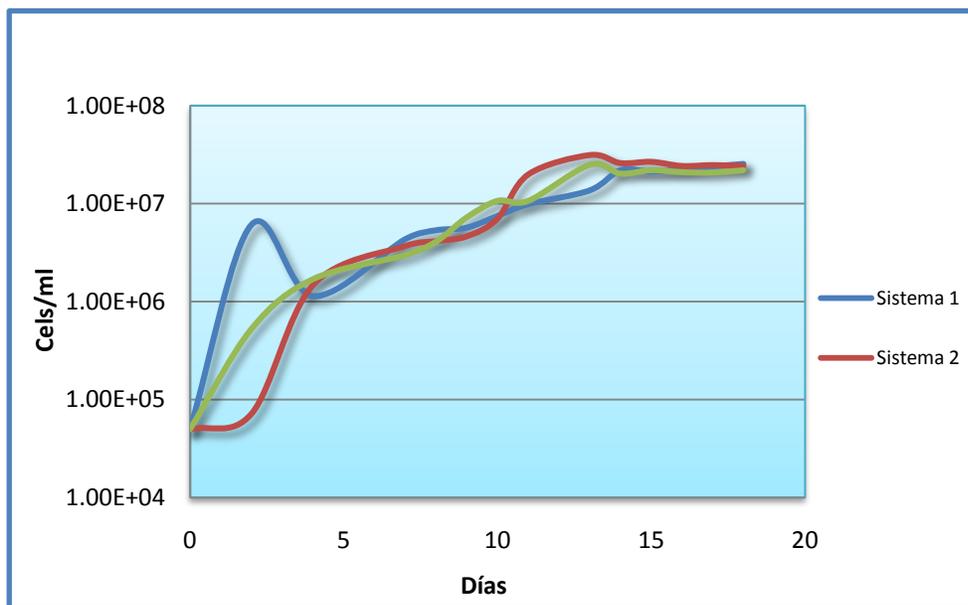


Figura 10. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella vulgaris* para los sistemas evaluados.

Existió un aumento en los sólidos totales (ST) y sólidos suspendidos totales (SST), debido a que a través del transcurso de los días, hay una mayor producción de biomasa en los sistemas (Figuras 11 y 12).

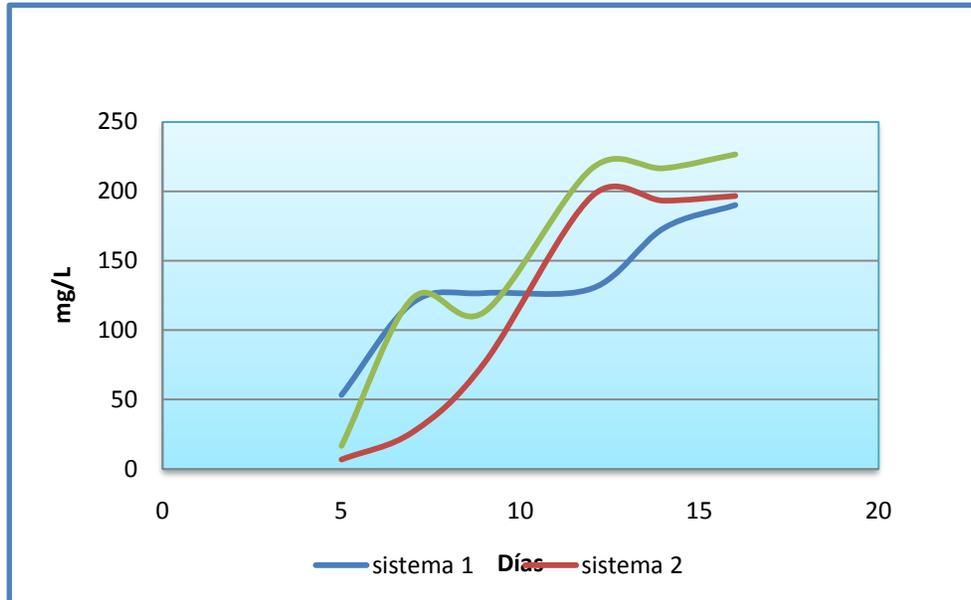


Figura 11. Comportamiento de los sólidos totales (ST) registrados durante toda la fase de evaluación.

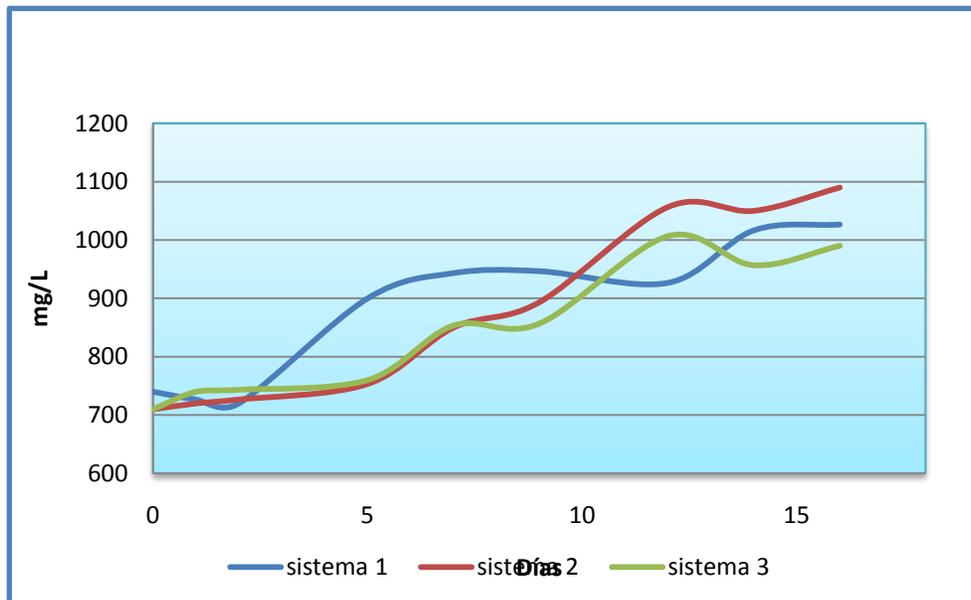


Figura 12. Comportamiento de sólidos suspendidos totales (SST) registrados durante toda la fase de evaluación.

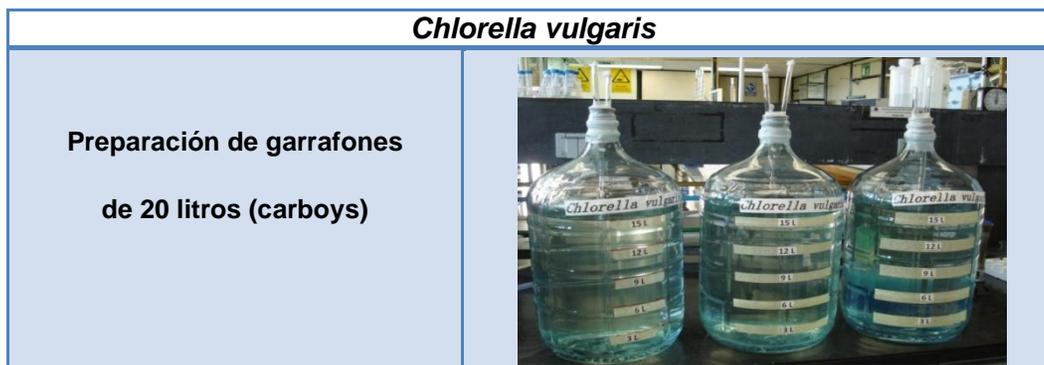
El valor inicial promedio de pH en los tres sistemas fue de 6.62 ± 0.0006 unidades, incrementándose durante el transcurso de los días hasta un pH promedio de 8.88 ± 0.02 .

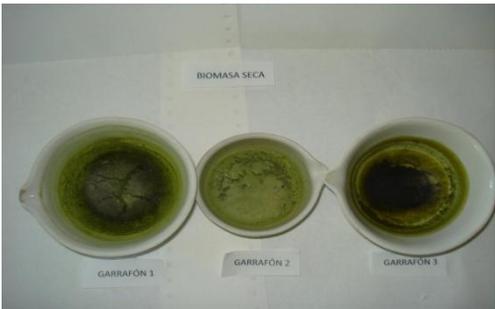
De acuerdo con los registros de temperatura obtenidos se detectó que ésta inicia a 25°C , incrementándose durante el transcurso de los días hasta $27 \pm 3^{\circ}\text{C}$ con pequeñas variaciones. Esta variación, se debió probablemente a la influencia de las oscilaciones de la temperatura ambiental ya que no se cuenta con una temperatura controlada en el laboratorio y ésta también depende de la época del año.

Con respecto a la producción de biomasa seca obtenida, se pudo observar que en los tres sistemas la producción de biomasa es similar (0.37 para el sistema 1, $0,35$ para el sistema 2 y de $0,33 \text{ gL}^{-1}$ para el sistema 3). Obteniéndose como valor promedio de biomasa seca de $0.35 \pm 0.02 \text{ gL}^{-1}$. Existe una tendencia similar de la biomasa seca obtenida en otro trabajo, el cual reporto 0.41 gL^{-1} de biomasa seca con una densidad celular de ($6 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$) durante la fase de crecimiento (14 días). En este estudio la biomasa fue menor, probablemente debido al método de obtención y secado de la misma (Illman *et al.*, 2000).

V.3.2 *Chlorella vulgaris* garrafón de 20 litros (carboy).

En la figura 13, se representa esquemáticamente la secuencia de trabajo para llevar a cabo la parte experimental III, iniciando desde la preparación del medio, crecimiento de la microalga, obtención de la biomasa, secado de la biomasa, destilación tipo Soxhlet, destilación simple con rotoevaporador hasta la obtención de aceite de la microalga *Chlorella vulgaris* en garrafones de 20 litros de capacidad (carboy).



<p>Inoculación de los carboys</p>	
<p>Crecimiento masivo en los carboys</p>	
<p>Obtención de biomasa</p>	
<p>Biomasa seca</p>	
<p>Destilación tipo Soxhlet</p>	

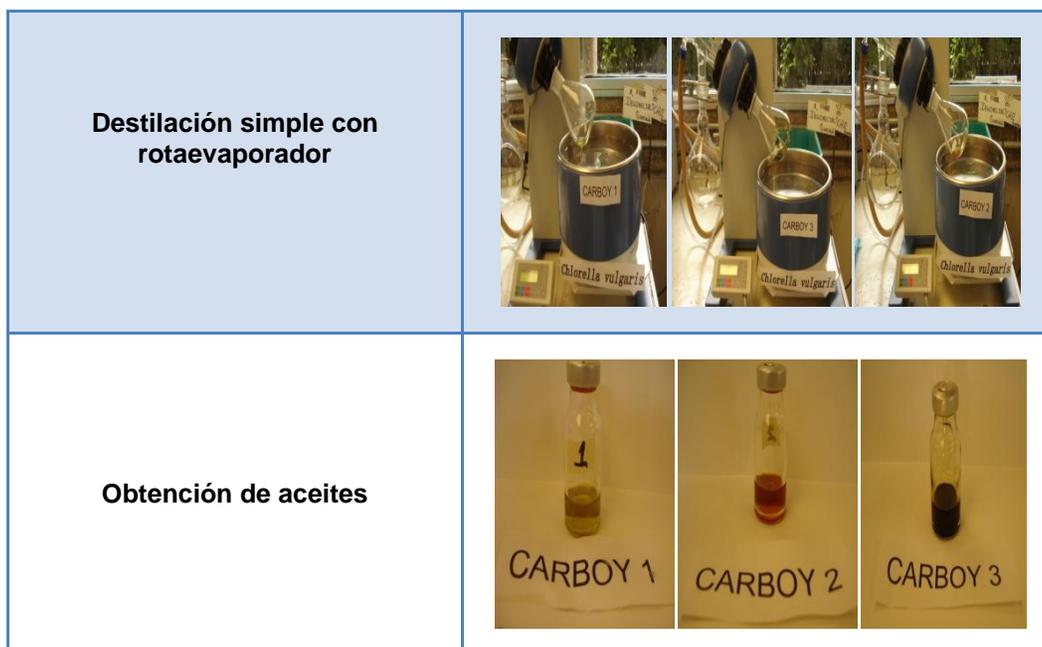


Figura 13. Representación esquemática del cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* desde la inoculación hasta la obtención de aceite en los sistemas carboy (triplicado).

Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹. El crecimiento de *Chlorella vulgaris*, presentó una tendencia similar en los tres carboys evaluados, con una fase de latencia o adaptación que culminó el día 6, con una densidad celular de $1,41 \times 10^5$ cel mL⁻¹ para el carboy 1; de $1,34 \times 10^5$ cel mL⁻¹ para el carboy 2 y de $1,74 \times 10^5$ cel mL⁻¹ para el carboy 3, respectivamente; la fase exponencial o logarítmica duró 23 días para el carboy 1 ($2,95 \times 10^7$ cel mL⁻¹); 24 días para el carboy 2 ($1,89 \times 10^7$ cel mL⁻¹) y de 24 días para el carboy 3 ($1,73 \times 10^7$ cel mL⁻¹).

Finalmente la fase estacionaria se presentó después 28 a 31 días para el carboy 1 (densidad celular promedio de $2,43 \times 10^7$ cel mL⁻¹); de 27 a 29 días para el carboy 2 (densidad celular promedio de $1,19 \times 10^7$ cel mL⁻¹), observándose que después de esta fase se presenta una caída en el crecimiento en los días 30 y 31 ($6,64 \times 10^6$ cel mL⁻¹) y de 27 a 31 días en el carboy 3 (densidad celular promedio de $1,28 \times 10^7$ cel mL⁻¹) (Figura 14).

En la tabla 8, se muestra el resumen de las densidades celulares obtenidas para cada fase de crecimiento en el sistema carboy para la microalga *Chlorella vulgaris*.

Tabla 8. Densidades celulares obtenidas para los sistemas evaluados por triplicado (carboy) para la microalga *Chlorella vulgaris*.

Fases de crecimiento en sistema carboy para <i>Chlorella vulgaris</i>						
Sistema	Latencia o adaptación		Exponencial o logarítmica		Estacionaria	
	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)
Carboy 1	6	1,41 X 10 ⁵	23	2,95 X 10 ⁷	28-31	2,43 X 10 ⁷
Carboy 2	6	1,34 X 10 ⁵	24	1,89 X 10 ⁷	27-29	1,19 X 10 ⁷
Carboy 3	6	1,74 X 10 ⁵	24	1,73 X 10 ⁷	27-31	1,28 X 10 ⁷

* Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de 1,00 X 10⁵ cel mL⁻¹ en ambos sistemas

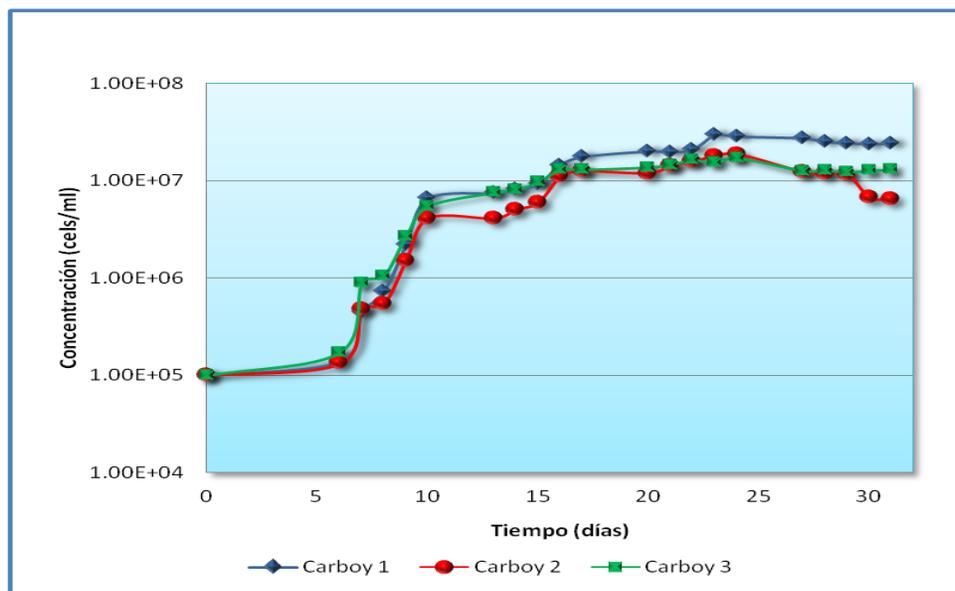


Figura 14. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en los tres sistemas (carboy) evaluados.

El valor inicial promedio de pH en los tres sistemas fue de 6.83 ± 0.0006 unidades, incrementándose durante el transcurso de los días hasta un pH promedio de 8.79 ± 0.02 (Figura 15).

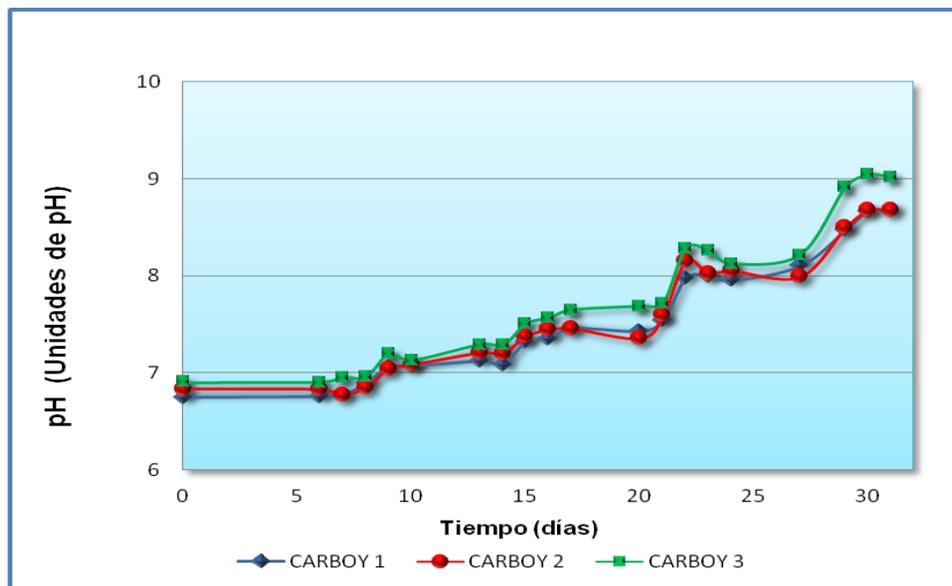


Figura 15. Comportamiento del pH registrado durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.

De acuerdo con los registros de temperatura obtenidos se detectó que ésta inicia a 26°C , incrementándose durante el transcurso de los días hasta $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con pequeñas variaciones, esta temperatura se pudo mantener constante gracias a que a los sistemas se les colocó un cinturón de calentamiento.

Con respecto al comportamiento de los sólidos registrados durante toda la fase de experimentación se pudo observar que, en los tres sistemas (carboy) el comportamiento de los sólidos totales (ST) fue variable, aumentando a través del tiempo hasta alcanzar un máximo valor el día 18 con valores de $1133,33 \text{ mgL}^{-1}$ para el carboy 1, de $1206,67 \text{ mgL}^{-1}$ para el carboy 2. El carboy 3 siguió aumentando hasta alcanzar un valor de $1056,67 \text{ mgL}^{-1}$. Finalmente los sólidos después del día 20 muestran valores constantes para el carboy 1 y carboy 2 (Figura 16).

Respecto a los sólidos totales volátiles (STV), los cuales representan la materia orgánica volátil presente, se pudo observar que también en los tres sistemas (carboy) el comportamiento fue variable, alcanzando su máximo valor el día 18 para el carboy 1 ($753,33 \text{ mgL}^{-1}$), carboy 2 ($603,33 \text{ mgL}^{-1}$) y a los 21 días para el carboy 3 ($490,00 \text{ mgL}^{-1}$). Finalmente se observó que existió un aumento en los sólidos, debido a que a través del transcurso de los días, hay una mayor producción de biomasa en los sistemas (Figura 17).

En los sólidos totales fijos (STF), los cuales representan la materia inorgánica presente (principalmente sales inorgánicas), se observó un comportamiento variable, alcanzando su máximo valor el día 14 para el carboy 1 ($500,00 \text{ mgL}^{-1}$), a los 18 días para el carboy 2 ($603,33 \text{ mgL}^{-1}$) y de 21 días para el carboy 3 ($576,67 \text{ mgL}^{-1}$) respectivamente (Figura 18).

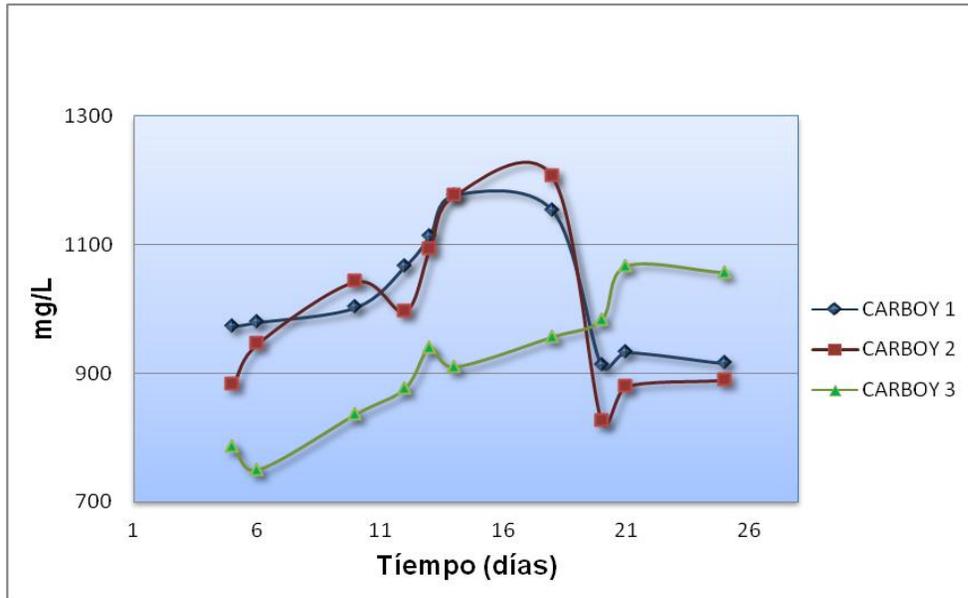


Figura 16. Comportamiento de los sólidos totales (ST) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.

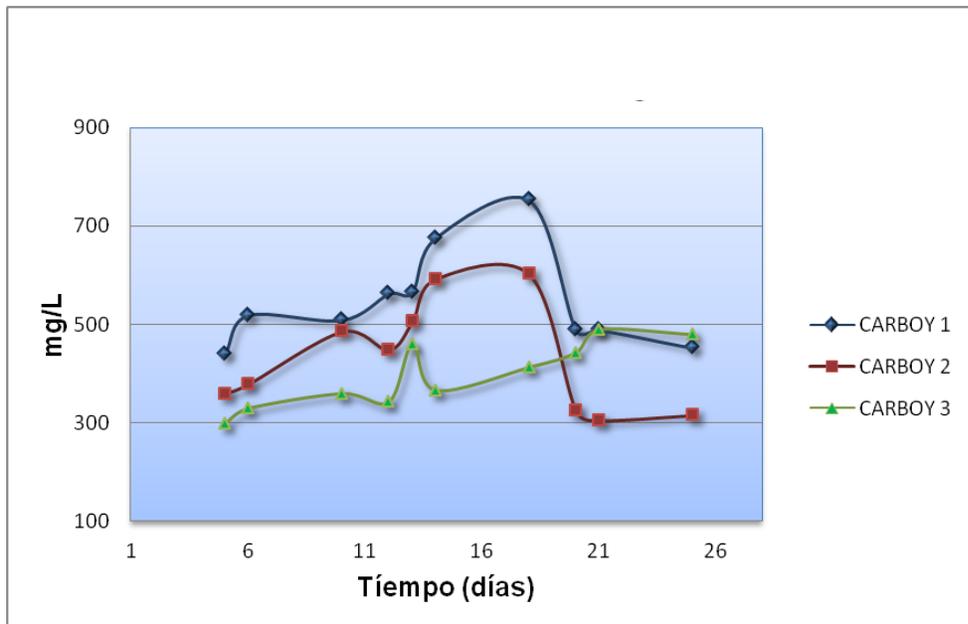


Figura 17. Comportamiento de los sólidos totales volátiles (STV) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.

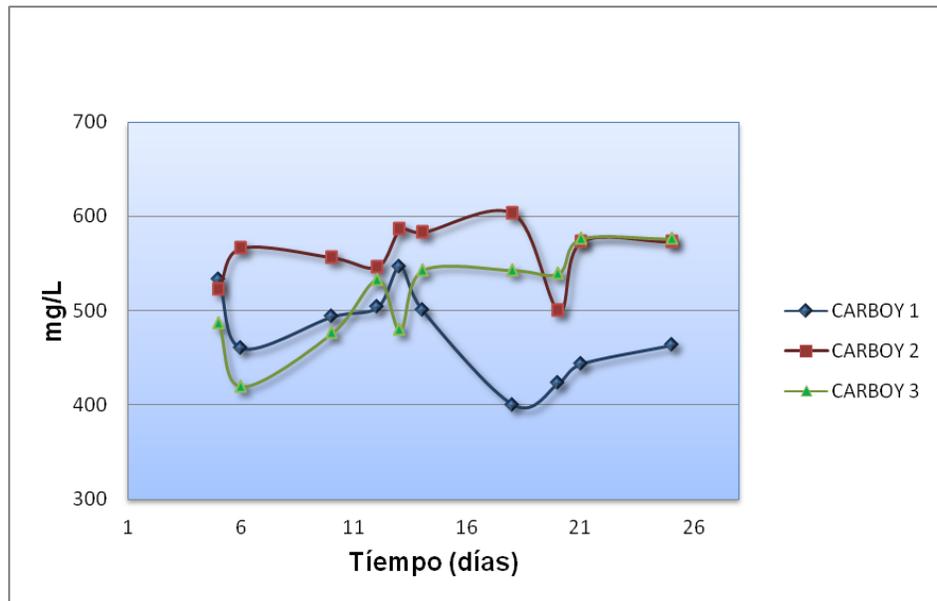
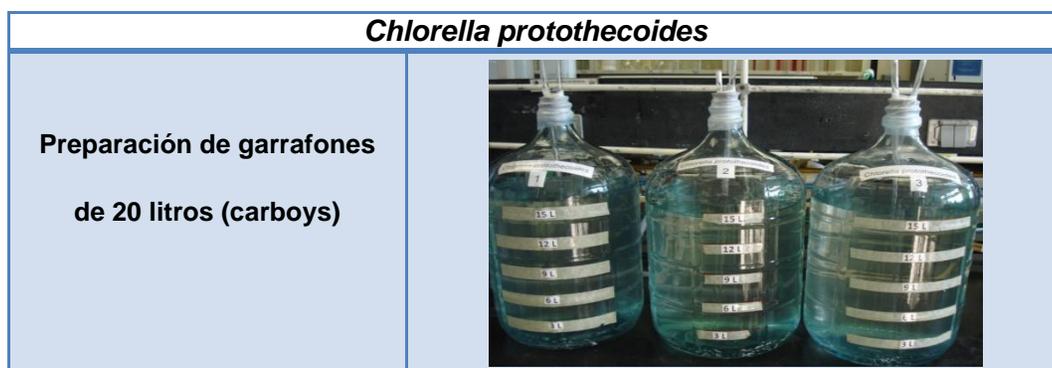
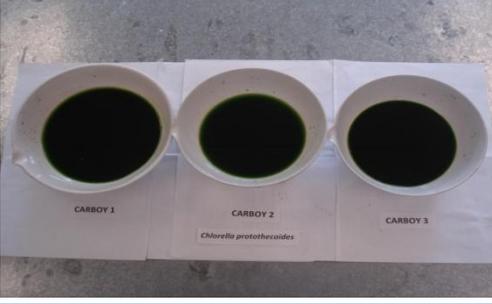
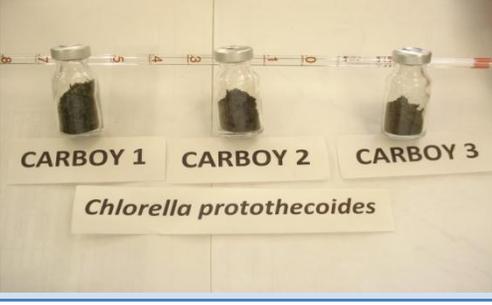
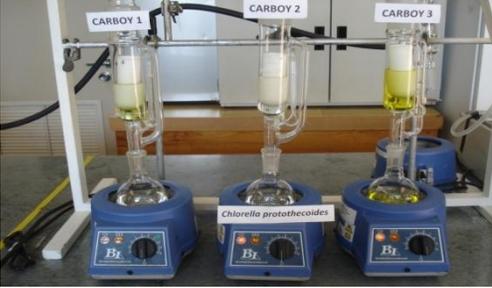


Figura 18. Comportamiento de los sólidos totales fijos (STF) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.

V.3.3 *Chlorella protothecoides* garrafón de 20 litros (carboy).

En la figura 19, se representa esquemáticamente la secuencia de trabajo para llevar a cabo la parte experimental III, iniciando desde la preparación del medio, crecimiento de la microalga, obtención de la biomasa, secado de la biomasa, destilación tipo Soxhlet, destilación simple con rotoevaporador hasta la obtención de aceite de la microalga *Chlorella protothecoides* en garrafones de 20 litros de capacidad (carboys).



<p>Inoculación de los carboys</p>	
<p>Crecimiento masivo en los carboys</p>	
<p>Obtención de biomasa</p>	
<p>Biomasa seca</p>	
<p>Destilación tipo Soxhlet</p>	

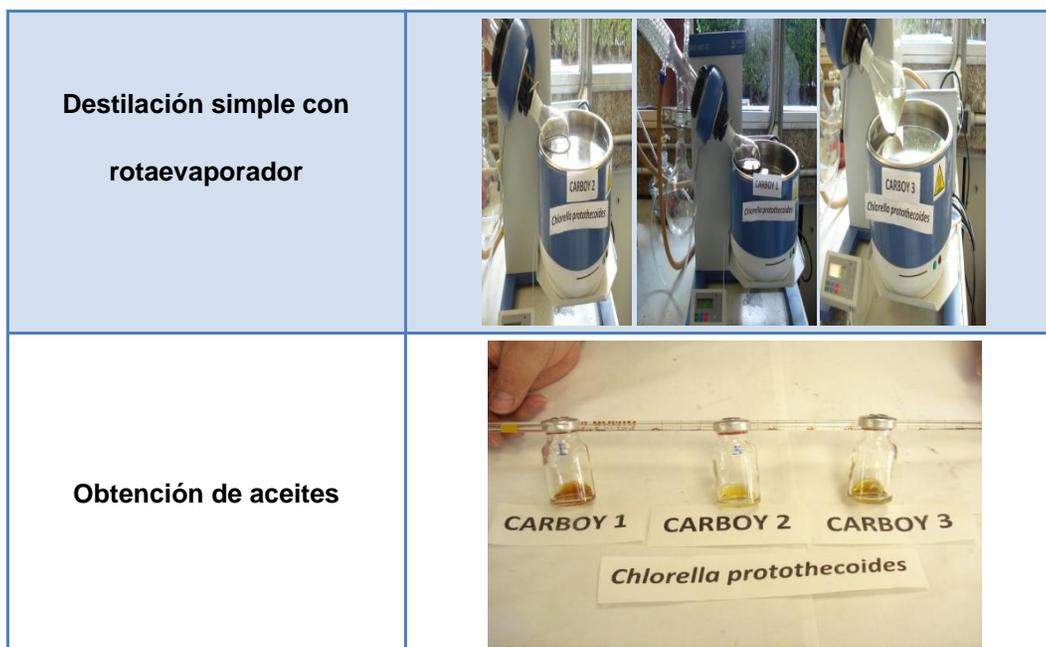


Figura 19. Representación esquemática del cultivo de la microalga *Chlorella protothecoides* desde la inoculación hasta la obtención de aceite en los sistemas carboy (triplicado).

Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de $1,00 \times 10^5$ cel mL⁻¹. El crecimiento de *Chlorella protothecoides*, presentó una tendencia de crecimiento casi idéntica en los tres carboys evaluados, con una fase de latencia o adaptación que culminó el día 4, con una densidad celular de $1,68 \times 10^5$ cel mL⁻¹ para el carboy 1; de $2,11 \times 10^5$ cel mL⁻¹ para el carboy 2 y de $1,90 \times 10^5$ cel mL⁻¹ para el carboy 3, respectivamente; la fase exponencial o logarítmica duró 21 días para el carboy 1 ($1,50 \times 10^7$ cel mL⁻¹); 20 días para el carboy 2 ($1,39 \times 10^7$ cel mL⁻¹) y de 20 días para el carboy 3 ($1,10 \times 10^7$ cel mL⁻¹).

Finalmente la fase estacionaria se presentó después 24 a 26 días para el carboy 1 (densidad celular promedio de $1,49 \times 10^7$ cel mL⁻¹); de 21 a 26 días para el carboy 2 (densidad celular promedio de $1,30 \times 10^7$ cel mL⁻¹) y de 21 a 26 días en el carboy 3 (densidad celular promedio de $1,08 \times 10^7$ cel mL⁻¹) (Figura 20).

En la 9, se muestra el resumen de las densidades celulares obtenidas para cada fase de la curva de crecimiento en el sistema carboy para la microalga *Chlorella protothecoides*.

Tabla 9. Densidades celulares obtenidas para los sistemas evaluados por triplicado (carboy) para la microalga *Chlorella protothecoides*.

Fases de crecimiento en sistema carboy para <i>Chlorella protothecoides</i>						
Sistema	Latencia o adaptación		Exponencial o logarítmica		Estacionaria	
	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)	Tiempo (días)	Densidad celular (cel mL ⁻¹)
Carboy 1	4	1,68 X 10 ⁵	21	1,50 X 10 ⁷	24-26	1,49 X 10 ⁷
Carboy 2	4	2,11 X 10 ⁵	20	1,39 X 10 ⁷	21-26	1,30 X 10 ⁷
Carboy 3	4	1,90 X 10 ⁵	20	1,10 X 10 ⁷	21-26	1,08 X 10 ⁷

* Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de 1,00 X 10⁵ cel mL⁻¹ en ambos sistemas.

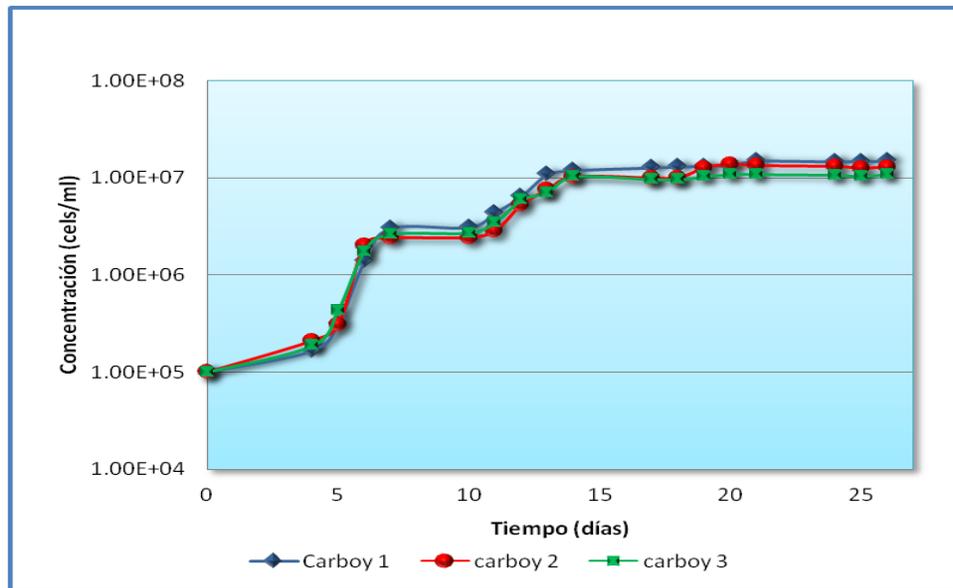


Figura 20. Comportamiento del crecimiento de *Chlorella protothecoides* en los tres carboys evaluados.

El valor inicial promedio de pH en los tres sistemas fue de 6.90 ± 0.0006 unidades, incrementándose durante el transcurso de los días hasta un pH promedio de 9.21 ± 0.04 (Figura 21).

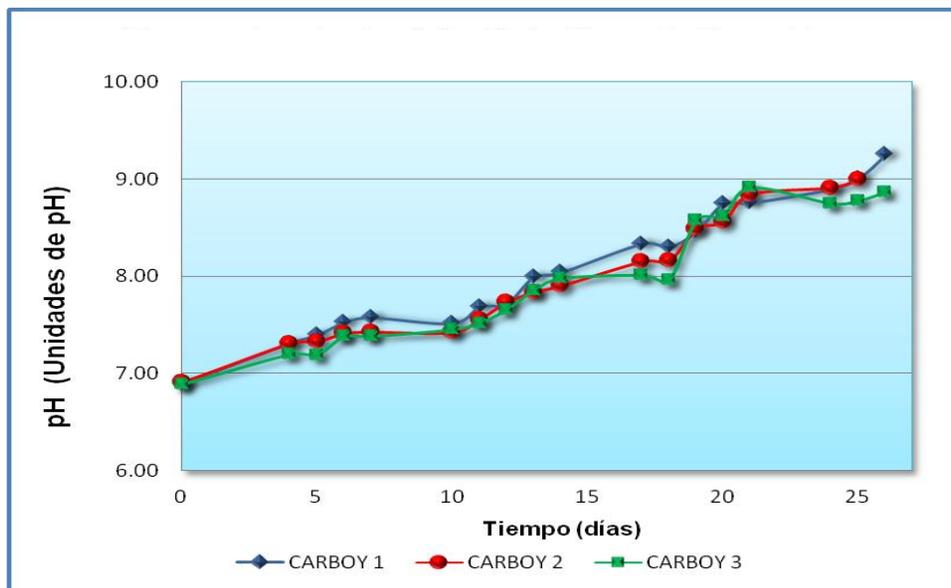


Figura 21. Comportamiento del pH registrado durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.

De acuerdo con los registros de temperatura obtenidos se detectó que ésta inicia a 26°C , incrementándose durante el transcurso de los días hasta $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con pequeñas variaciones, esta temperatura se pudo mantener constante gracias a que a los sistemas se les colocó un cinturón de calentamiento.

Con respecto al comportamiento de los sólidos registrados durante toda la fase de experimentación, se pudo observar que en los tres sistemas (carboy), los sólidos totales (ST), sólidos totales volátiles (STV) y sólidos totales fijos (STF) presentan un mejor comportamiento, es decir se observa que a través del transcurso de los días, la tendencia es incrementar.

Los sólidos totales (ST), se incrementaron a través del tiempo de experimentación, alcanzando valores de $1110,00 \text{ mgL}^{-1}$ para el carboy 1, de $986,87 \text{ mgL}^{-1}$ para el carboy 2 y de $1070,00 \text{ mgL}^{-1}$ para el carboy 3 hasta el día 25 (Figura 22).

Los sólidos totales volátiles (STV), los cuales representan la materia orgánica volátil presente, también presentaron un comportamiento a incrementarse, debido a que a través del tiempo hay un aumento en la cantidad de biomasa producida, alcanzando concentraciones de $500,00 \text{ mgL}^{-1}$ para el carboy 1, de $390,00 \text{ mgL}^{-1}$ para el carboy 2 y de $360,00 \text{ mgL}^{-1}$ para el carboy 3 hasta el día 25 (Figura 23).

En los sólidos totales fijos (STF), los cuales representan la materia inorgánica presente (principalmente sales inorgánicas), se observó un comportamiento también al incremento, alcanzando valores de $610,00 \text{ mgL}^{-1}$ para el carboy 1, de $596,67 \text{ mgL}^{-1}$ para el carboy 2 y de $710,00 \text{ mgL}^{-1}$ para el carboy 3 hasta el día 25 (Figura 24).

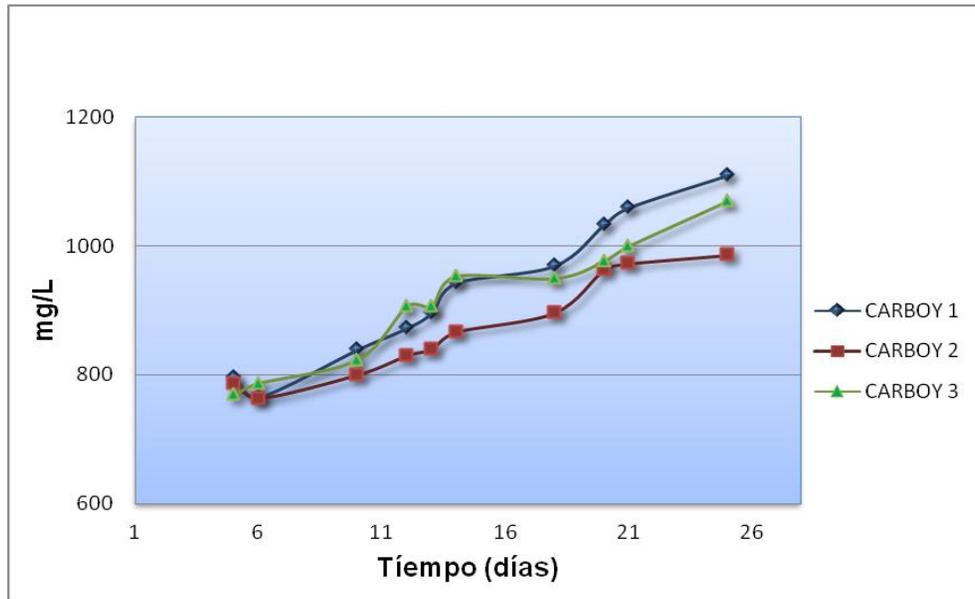


Figura 22. Comportamiento de los sólidos totales (ST) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.

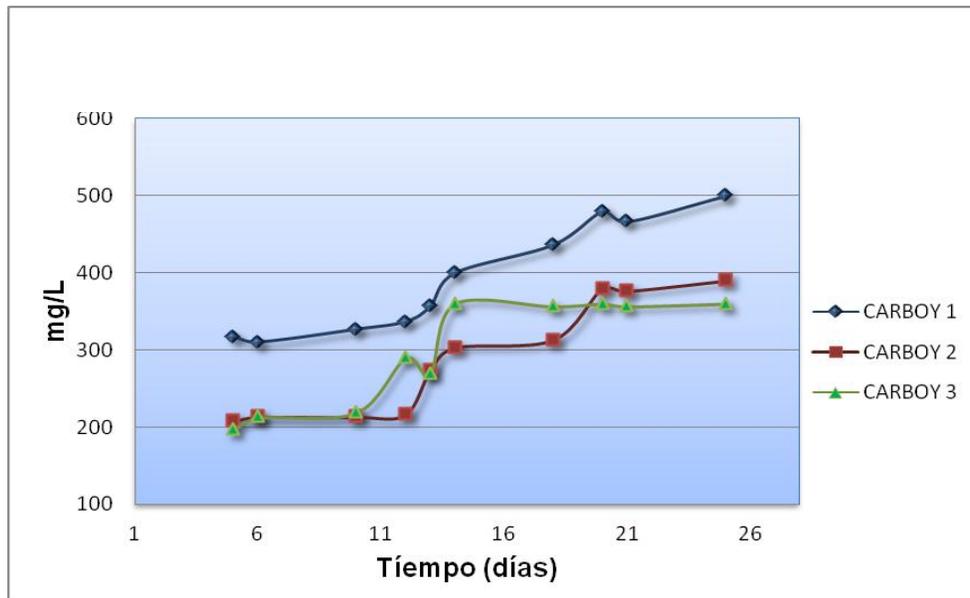


Figura 23. Comportamiento de los sólidos totales volátiles (STV) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.

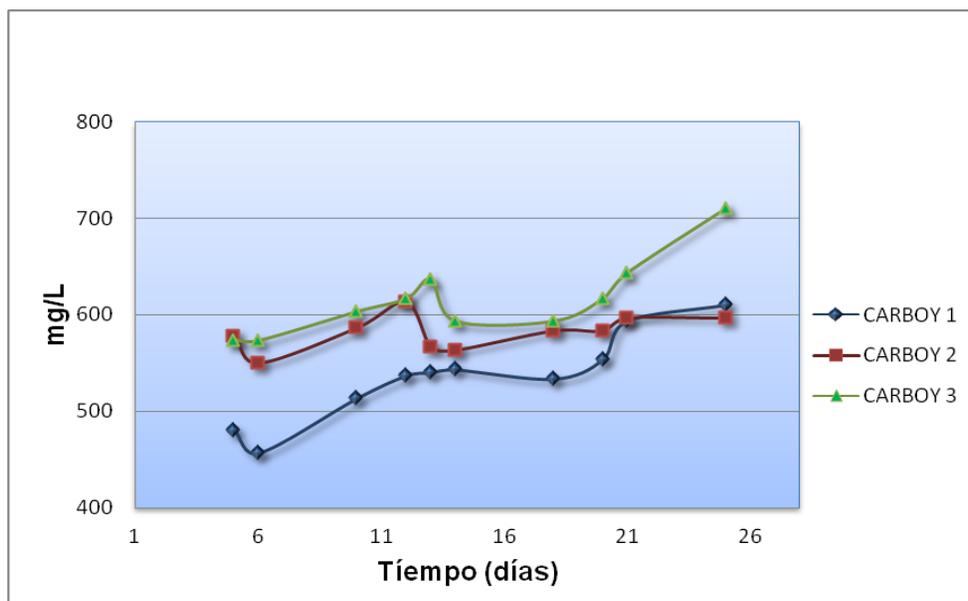


Figura 24. Comportamiento de los sólidos totales fijos (STF) registrados durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.

V.3.4 *Chlorella vulgaris* escalamiento y sistema por triplicado (matraz Erlenmeyer de 1000 mL).

Cuando la microalga es cultivada a nivel de escalamiento (matraz de 1000 mL) bajo condiciones autótrofas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, aireación constante, iluminación continua (8500 luxes) y fotoperiodo 12:12 (luz-obscuridad) contra el sistema por triplicado en matraces Erlenmeyer de 1000 mL, se pudo observar que en los dos casos la microalga presenta una fase de latencia o adaptación que culminó el día 2 con densidades celulares variables, presentando solo el sistema 1 una densidad mayor ($6,13 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$); la fase exponencial o logarítmica para ambos casos también culminó entre el día 13 y 14 con densidades celulares similares en el sistema 1 ($2,33 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$) y 3 ($2,12 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$) y con una mayor densidad en el sistema 2 ($2,52 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$). Finalmente en la fase estacionaria se presenta para ambos casos entre 14-18 días, obteniéndose mayores densidades celulares en el sistema por triplicado, con una densidad celular promedio de ($2,32 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$)

Mientras que cuando la microalga es cultivada a nivel de escalamiento (carboy) bajo condiciones autótrofas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, aireación constante, iluminación continua (8500 luxes) y fotoperiodo 12:12 (luz-obscuridad) contra el sistema por triplicado (carboy) a una temperatura de 26 a 28°C y una iluminación continua de 1200 luxes, se observó que en los dos casos la microalga presenta una fase de latencia o adaptación, alcanzándola más rápidamente en el escalamiento (4 días) con una densidad celular de $1,16 \times 10^5$ en comparación con

el sistema por triplicado (6 días) con una densidad celular promedio de $1,50 \times 10^5$ cel mL⁻¹; la fase exponencial o logarítmica, culminó el día 33 para el escalamiento ($1,11 \times 10^7$) y de 23 a 24 días en el sistema por triplicado con una densidad promedio de ($2,19 \times 10^7$ cel mL⁻¹). Finalmente la fase estacionaria se presenta el día 38 en el escalamiento ($1,09 \times 10^7$) y de 27 a 31 días en el sistema por triplicado con una densidad promedio de ($1,63 \times 10^7$ cel mL⁻¹).

V.3.5 *Chlorella protothecoides* escalamiento y sistema por triplicado (carboy)

Cuando la microalga es cultivada a nivel de escalamiento (carboy) bajo condiciones autótrofas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, aireación constante, iluminación continua (8500 luxes) y fotoperiodo 12:12 (luz-obscuridad) contra el sistema por triplicado (carboy) a una temperatura de 26 a 28°C y una iluminación continua de 1200 luxes, se observó que en los dos casos la microalga presenta una fase de latencia o adaptación, alcanzándola más rápidamente en el escalamiento (3 días) con una densidad celular de $1,42 \times 10^5$ en comparación con el sistema por triplicado (4 días) con una densidad celular promedio de $1,90 \times 10^5$ cel mL⁻¹; la fase exponencial o logarítmica, culminó el día 16 para el escalamiento ($1,10 \times 10^6$) y de 20 a 21 días en el sistema por triplicado con una densidad promedio de ($1,33 \times 10^7$ cel mL⁻¹). Finalmente la fase estacionaria se presenta el día 24 en el escalamiento ($2,80 \times 10^6$) y de 21 a 26 días en el sistema por triplicado con una densidad promedio de ($1,29 \times 10^7$ cel mL⁻¹).

Como conclusión, se puede mencionar que cuando se trabajo bajo las mismas condiciones de cultivo para la microalga *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*, pero aumentando la temperatura de 25°C a $26-28^\circ\text{C}$ y una iluminación continua de 8500 luxes a 1200 luxes, se observa que esta variación de las condiciones de cultivo es adecuada para el sistema por triplicado (carboy) ya que se obtuvieron densidades celulares mayores y por tanto una mayor producción de biomasa.

Los resultados mostraron que los sistemas por triplicado presentan óptimas curvas de crecimiento y producción de biomasa, esto demuestra que la manipulación de los cultivos para la producción de biomasa debe estar en función de la iluminación tomando en cuenta la calidad de la luz, irradiancia y fotoperiodo.

La temperatura no solo afecta las reacciones celulares, sino también los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa así como la solubilidad de los gases en el agua (Abalde *et al.*, 1995).

Varios autores han realizado diversos trabajos sobre la influencia de la iluminación en cianobacterias y muchas de ellas se caracterizan por crecer de manera óptima a irradiancias bajas e intermedias (Baldia *et al.*, 1991; Romo, 1994; Loreto *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2007; Beljanin & Trenkenu, 1977).

En otras cianobacterias y microalgas se ha reportado cambios en el contenido proteico con la intensidad luminosa, mejorando la producción a irradiancias bajas e intermedias (Ben-Amotz, 1987; Loreto *et al.*, 2003). De tal manera que a una mayor disponibilidad de luz, se necesitan menos componentes estructurales funcionales para la captación de la energía radiante (Maseda, 2002).

Chlorella vulgaris, actualmente representa un sistema biológico ideal para diferentes líneas de investigación y además presenta una alta eficiencia por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio.

Por lo tanto, es importante destacar que la productividad de ciertas microalgas en condiciones autótrofas está relacionada con la utilización simultánea y eficiente de compuestos orgánicos y de CO₂ como fuente de carbono, de luz como fuente de energía, de tal manera que en los cultivos se genere una producción adecuada de biomasa (Brown, 1989).

Con respecto a la producción de biomasa seca obtenida, se pudo observar que en los tres sistemas (matraz Erlenmeyer) la producción de biomasa es similar (0.37 para el sistema 1, 0.35 para el sistema 2 y de 0.33 gL⁻¹ para el sistema 3). Obteniéndose como valor promedio de biomasa seca de 0.35 ± 0.02 gL⁻¹.

La producción de biomasa seca obtenida para *Chlorella vulgaris* en el sistema carboy o garrafón evaluado por triplicado fue de 2,99 para el carboy 1; 2,41 para el carboy 2 y de 3,26 g/15L para el carboy 3. Para el caso de *Chlorella protothecoides* la producción de biomasa fue de 3,04 para el carboy 1; de 2,33 para el carboy 2 y de 2,62 g/15L para el carboy 3.

V.3.6 Composición de ácidos grasos (átomos de carbono)

De acuerdo a los resultados obtenidos de las muestras de aceite analizadas en el cromatógrafo de gases para la microalga *Chlorella protothecoides*, se observó que para los tres sistema evaluados (carboy) la composición de ácidos grasos incluye moléculas lineales de 7 a 21 átomos de carbono, encontrándose que los ácidos grasos presentan una variación en porcentaje, siendo el más elevado el átomo de carbono 10C (20.71 carboy 1; 42.16 carboy 2 y 32.61 carboy 3, respectivamente) (Tabla 10).

En el caso de la microalga *Chlorella vulgaris*, solo se evaluó el carboy 2, debido a que las muestras de aceite obtenidas para el carboy 1 y 3 no se evaporaron adecuadamente (es decir, contenían aun un alto porcentaje de hexano), por lo que en el momento del análisis solo la muestra de aceite del carboy 2, se encontraba concentrado, es decir el solvente orgánico (hexano) utilizado se había evaporado totalmente. Los resultados indicaron que la composición de ácidos grasos incluye moléculas lineales de 7 a 22 átomos de carbono, encontrándose que los ácidos grasos también presentan una variación en porcentaje, siendo el más elevado el

átomo de carbono 10C (23.62), seguido del 12C (17.54); 14C (15.42) y del 9C(11.09) (Tabla 11).

Esto concuerda con varios autores (Cohen, 1986; Hu *et al.*, 2008; Griffiths & Harrison, 2009; Garibay *et al.*, 2009), en donde mencionan que la composición de las microalgas comúnmente incluye moléculas lineales de 12 a 22 átomos de carbono en número par, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1 a 6) es variable, siendo por lo general *cis* la configuración de éstos. Además de que los ácidos grasos de 16C a 18C son los más frecuentes, no obstante moléculas de cadena media (10C, 12C, 14C) o demasiado larga (> 20C) predominan en algunas especies.

Finalmente, estos autores mencionan que por lo general en las microalgas dulceacuícolas prevalecen los ácidos grasos saturados y mono-insaturados, observándose en menor proporción compuestos poli-insaturados (PUFAs, Polyunsaturated Fatty Acids) y que la variación del perfil de ácidos grasos entre grupos microalgales diversos es considerable, variabilidad que igualmente se exhibe bajo distintas condiciones de cultivo.

Tabla 10. Composición (%) de ácidos grasos encontrados en *Chlorella protothecoides*.

Ácido graso	Porcentaje (%) isómeros de alcanos		
	CARBOY 1	CARBOY 2	CARBOY 3
7C	5.13	19.04	4.93
8C	11.69	0.00	11.78
9C	13.53	0.00	16.78
10C	20.71	42.16	32.61
11C	7.43	0.00	6.06
12C	8.98	0.00	5.22
13C	7.27	9.74	5.53
14C	10.31	23.82	7.47
15C	5.88	0.00	4.29
16C	4.12	0.00	2.08
17C	2.17	3.14	0.95
18C	1.15	0.00	0.66
19C	0.74	1.16	0.89
20C	0.47	0.55	0.30
21C	0.42	0.38	0.44
22C	0.00	0.00	0.00

Tabla 11. Composición (%) de ácidos grasos encontrados en *Chlorella vulgaris*

Porcentaje (%) isómeros de alcanos	
Ácido graso	CARBOY 2
7C	2.22
8C	5.66
9C	11.09
10C	23.62
11C	8.74
12C	17.54
13C	0.00
14C	15.42
15C	0.00
16C	2.98
17C	1.80
18C	1.98
19C	3.18
20C	1.45
21C	3.79
22C	0.53

En el Anexo D, se presentan los porcentajes de área o porcentaje en peso y los espectogramas de las muestras de aceite analizadas por cromatografía de gases en el cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard GC System, modelo 6890.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

VI.1 Conclusiones y recomendaciones para la fase experimental I

Las técnicas de aislamiento utilizadas en estas fases experimentales, son clave para poder aislar y purificar especies de microalgas de interés.

No se obtuvieron resultados satisfactorios con los seis medios de cultivos evaluados (medio Watanabe a pH de 6 y 8, medio Basal de Bold y Watanabe con 10 y 20 gL⁻¹ de glucosa) para el crecimiento de *Chlorella protothecoides*, debido a que en ninguno de los medios existió un crecimiento adecuado.

Al esterilizar el medio de cultivo Watanabe a pH de 6 y 8 se forma un precipitado de hierro, no favoreciendo el crecimiento de la microalga *Chlorella protothecoides*.

En el Medio Basal de Bold y Watanabe con 10 y 20 g/L de glucosa, se observó que la microalga *Chlorella protothecoides* comienza a crecer, pero con el transcurso de los días, comienza a presentarse una contaminación del medio por bacterias, tornándose blanquecino (turbio).

Se encontró que el medio Basal de Bold modificado es el más apropiado para el cultivo de *Chlorella protothecoides* respecto a los demás medios de cultivos evaluados y bajo las condiciones experimentales trabajadas.

Se esperaba que se obtuvieran resultados parecidos a los realizados por otros autores, al utilizar a la microalga *Chlorella protothecoides* bajo condiciones de laboratorio y heterótrofas, obteniéndose mayores tasas de crecimiento y acumulación de lípidos, solo que en este caso no fue posible comprobarlo.

En los medios de cultivo evaluados (MBB, MBB modificado y Watanabe bajo en nitrógeno), se presentó una tendencia similar de crecimiento, observándose las fases características de un cultivo discontinuo (fase de latencia, exponencial o logarítmica y estacionaria).

Recomendaciones

Llevar a cabo trabajos de investigación a nivel laboratorio y bajo condiciones heterótrofas de las dos microalgas bajo estudio *Chlorella protothecoides* y *Chlorella vulgaris*.

VI.2 Conclusiones y recomendaciones para la fase experimental II

El medio de cultivo Basal de Bold (MBB) y el medio Basal de Bold modificado favorecen un buen crecimiento y producción de biomasa de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*.

Las curvas de crecimiento obtenidas a partir de conteos en la cámara de Neubauer mostraron en cada uno de los sistemas, las fases características de un cultivo discontinuo (fase de latencia, exponencial o logarítmica y estacionaria), observándose un incremento del volumen celular durante la fase log.

En los sistemas evaluados (matraz Erlenmeyer de 1000 ml y carboy), existió un aumento en los sólidos totales (ST) durante toda la fase experimental, debido a que a través del transcurso de los días, hay una mayor producción de biomasa.

La producción de biomasa seca obtenida para *Chlorella vulgaris* en el matraz de 1000 ml fue de $0,33 \text{ gL}^{-1}$ y en el carboy o garrafón de aproximadamente $4,5 \text{ g/15 L}$. Mientras que para *Chlorella protothecoides* fue 0.057 gL^{-1} en el matraz de 1000 mL y de $1,06 \text{ g/15L}$ en el carboy.

Las microalgas estudiadas han sido sugeridas como buenas candidatas para la obtención de aceite y producción de biocombustible, debido a sus avances de alta eficiencia fotosintética, alta producción de biomasa y el crecimiento más rápido en comparación con otras cosechas energéticas.

Chlorella vulgaris, actualmente representa un sistema biológico ideal para diferentes líneas de investigación y además presenta una alta eficiencia por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio.

Recomendaciones

Este fue un estudio preliminar, con el fin de estudiar el escalamiento de cultivo de dos especies de microalgas en sistemas eficientes y a nivel laboratorio, lo cual constituye una base actual para el seguimiento de mas estudios de escalamiento para otras especies, con el fin de obtener subproductos (proteína, carbohidratos, biopolímeros, lípidos, biomasa y biogás, etc.) y biocombustible a partir del cultivo de las mismas, así como para contar con la información necesaria de las mejores condiciones de cultivo para el escalamiento a mayor escala (fermentadores, bioreactores cerrados y abiertos, etc.), a escala piloto e industrial con el objetivo de obtener una alta densidad celular y mayor producción de biomasa.

Se sugiere realizar un análisis bioquímico, monitoreando durante la cinética de crecimiento, el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos y clorofila.

Llevar a cabo trabajos de investigación a nivel escalamiento, bajo condiciones de laboratorio y heterótrofas de las dos microalgas bajo estudio *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*.

VI.3 Conclusiones y recomendaciones para la fase experimental III

Este trabajo de investigación, se realizó como una alternativa viable en la búsqueda de fuentes alternas de energía, que en un futuro podrían disminuir la dependencia de petróleo.

Se llevó a cabo el cultivo de dos especies de microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides*), orientadas principalmente a la producción de biomasa y obtención de aceites así como estandarizar el método de cultivo bajo condiciones de laboratorio.

Finalmente, la presente tesis pretende servir de apoyo y/o guía para dar las bases necesarias para el cultivo de microalgas, obtención de aceite y producción de biomasa con fines energéticos, aunque su participación será a largo plazo.

Los resultados muestran que *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* mantienen una producción diaria de biomasa durante toda la fase de experimentación, bajo las condiciones de laboratorio establecidas, autótrofas y como sistema semicontinuo. Esta estabilidad de la densidad celular se debe a la renovación de nutrientes.

La estandarización del método de cultivo de microalgas servirá como base para el cultivo adecuado de microalgas a nivel laboratorio, debido a que existe un interés creciente por el desarrollo de técnicas eficientes para el cultivo de microalgas.

Recomendaciones

Realizar la destilación en el sistema Soxhlet de 12 a 16 horas, con el fin de llevar a cabo eficientemente la extracción de los lípidos presentes en la biomasa seca.

Evaporar en el rotoevaporador (destilación simple) la mayor cantidad del solvente químico (hexano), con el fin de que el solvente no provoque que aparezcan grandes picos cuando se determinan los ácidos grasos presentes en las muestras.

Cuando se obtienen los aceites por medio de la destilación simple (rotoevaporador), es recomendable que se adicione un solvente inorgánico (bisulfuro), con el propósito de evitar que interfiera en las determinaciones de los ácidos grasos.

Buscar otro método de secado (luz solar, spray, cilindros de calor, entre otros) de la biomasa obtenida, debido a que para cultivos a pequeña y mediana escala sería

factible pero inviable para cultivos a gran escala. Además de que el tiempo de secado es grande (48 a 72 horas) y costoso en inversión de energía.

Es necesario buscar otro método de cosecha de las microalgas bajo estudio, debido a que en el laboratorio no se cuenta con un refrigerador de gran tamaño, por lo que los garrafones (carboys) fueron colocados en un lugar sin luz y en donde nadie pudiera moverlos, con el fin de favorecer la sedimentación natural, solo que el tiempo de sedimentación es muy largo (2 a 3 semanas). Este método sería factible para cultivos a pequeña y mediana escala pero inviable para cultivos a mediana o gran escala.

Es necesario controlar la contaminación (principalmente bacterias y protozoos) del medio de cultivo de microalgas, con el fin de obtener curvas de crecimiento reales, así como una adecuada producción y calidad de la biomasa producida.

El 90% de las especies de microalgas están aún por valorarse, por lo que es necesario llevar a cabo trabajos de investigación, es decir investigar y desarrollar la bioprospección de nuevas especies de microalgas.

Llevar a cabo más investigaciones a nivel laboratorio para determinar que especies de microalgas bajo estas condiciones de cultivo son las más adecuadas para escalamientos de cultivo para la producción de biomasa, obtención de aceite y obtención de biodiesel.

Estudiar cepas de microalgas resistentes a factores medio-ambientales, de tal forma que se facilite su producción a pequeña, mediana y gran escala con el mínimo de contaminaciones.

Es necesario buscar especies de microalgas de mayor tamaño y de mejor capacidad de sedimentación, con el objetivo de reciclar las aguas empleadas y optimizar el proceso de cosechado (barato).

Crear instalaciones para la conservación y mantenimiento de microalgas (colecciones y/o banco de microalgas) público o privado. Existen bancos de microalgas de referencia a nivel mundial, el disponer de un banco a nivel nacional permitiría disponer de un centro de ensayo en condiciones estándar y/o definidas así como apoyo a grupos o centros de investigación.

Realizar estudios con medios de cultivos estériles y no estériles con el propósito de evaluar el comportamiento (cinéticas) de crecimiento de las dos microalgas, verificando el grado de contaminación que se puede alcanzar, debido a que a nivel piloto, semi-industrial o industrial es imposible económicamente esterilizar el medio de cultivo.

Es necesario después de desarrollar investigación sobre el cultivo de microalgas, el desarrollo de procesos a escala piloto e industrial bajo condiciones reales de operación.

Con los resultados de este estudio de investigación sobre el cultivo de microalgas a nivel escalable y producción de biomasa y obtención de aceites, es necesario demostrar que es factible llevarlo a escala piloto-semi-industrial o industrial ya que según avances en la investigación, es necesario contar con instalaciones piloto, en las que se pueda verificar y demostrar el cultivo de las microalgas de forma que los datos obtenidos permitan la implantación de la producción de microalgas con fines energéticos a gran escala.

Orientar este trabajo de investigación a la obtención de biodiesel, con el objetivo de implementar un proyecto a escala piloto, semi-industrial e industrial (escalamiento a mayor escala), como una alternativa viable en la búsqueda de fuentes alternas de energía y que en un futuro pueda disminuir la dependencia del petróleo.

VI.4. Comentarios finales

Bioenergía

Este trabajo de investigación, pretende brindar una visión global del potencial de la bioenergía del cultivo de microalgas, así como los retos que enfrenta para convertirse en un futuro próximo en un pilar importante para la producción de energía.

La bioenergía de biomasa, es una fuente estratégica para promover la transición hacia un patrón energético más sustentable, dominado por las energías renovables y que promueve un uso eficiente, descentralizado y equitativo de la energía.

Se carece todavía de un marco regulatorio y de política pública propicio al desarrollo en gran escala de la bioenergía, tarea que requiere de una serie de acciones estratégicas con visión a largo plazo y del apoyo de un amplio conjunto de políticas y de recursos públicos.

Produciendo y utilizando sustentablemente la bioenergía, ésta puede contribuir a la mitigación del cambio climático porque sustituye a los combustibles fósiles, mantiene o incrementa almacenes de carbono y evita la deforestación.

Fomentar la investigación y el desarrollo tecnológico, con el fin de apoyar el desarrollo de grupos de investigación en temas clave, proyectos pilotos y demostrativos, es un aspecto fundamental en la bioenergía.

Se ha demostrado que iniciar proyectos de energía renovable puede resultar difícil y a veces complicado, pues existen barreras institucionales, legales, financieras y tecnológicas. Sin embargo, la investigación, el desarrollo tecnológico, las mejoras en la eficiencia energética, la reducción de costos de producción, el desarrollo e implantación de criterios de sostenibilidad y la aplicación eficaz de medidas de fomento del uso de la bioenergía, serán aspectos decisivos en el desarrollo de esta fuente de energía.

La bioenergía internacionalmente, está teniendo un desarrollo acelerado, que va desde iniciativas globales para promover el uso de estufas eficientes y limpias hasta el desarrollo de sistemas masivos de producción, distribución, uso y certificación de biodiesel (plantas oleaginosas y microalgas) y bioetanol.

México se encuentra muy lejos de poder hacer realidades las oportunidades del uso de la bioenergía a gran escala, aunque hay avances en cuestiones regulatorias y de incentivos a tecnologías específicas o a la investigación y desarrollo.

Microalgas

Las microalgas se perfilan como una alternativa interesante para obtener materia prima para biodiesel, ya que su productividad en teoría superaría la del cultivo agrícola y además no competiría con la producción de alimentos.

El estudio y seguimiento del cultivo de diferentes especies de microalgas a nivel de escalamiento es de vital importancia, con el objetivo de evaluar su comportamiento de crecimiento, su composición bioquímica y los parámetros ambientales para su mejor desarrollo en sistemas cerrados.

Pocas especies de microalgas, incluyendo algunas especies de *Chlorella* han sido reportadas que tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de lípidos en las células bajo condiciones favorables.

Existen muchos retos por superar antes de que el biodiesel generado a partir de microalgas resulte viable, tales como la: falta de conocimiento sobre su genética, la resistencia de su pared celular (complica la extracción del aceite) y la composición del aceite (rico en ácidos grasos poli-insaturados que se pueden oxidar muy fácilmente).

Se ha estimado que para que el biodiesel de microalgas sea competitivo en costos y producción por hectárea, tendría que incrementarse 300 veces los rendimientos. Por lo tanto, se prevé que cuando se logren superar estos retos, las microalgas serán una fuente sustentable, no sólo de biodiesel sino de otros combustibles, alimentos y químicos.

Existen muchas plantas en operación y producción comercial dedicadas al biodiesel de primera generación. Sin embargo, sólo existen proyectos demostrativos o pre-comerciales que utilizan materias primas o tecnologías novedosas. Los desarrollos con microalgas se han multiplicado especialmente en los últimos tres años.

En conclusión, el papel que juegan las microalgas para la producción de energía renovable es importante, aunque su participación será a largo plazo. Actualmente es un sector con gran potencial, pero que se encuentra en la fase de investigación y desarrollo tecnológico previa al desarrollo comercial a planta piloto y gran escala.

Es importante además analizar el ciclo de vida completo de los sistemas basados en microalgas para establecer su viabilidad y sustentabilidad.

Cultivo de microalgas

Se requiere fomentar la investigación y desarrollo mediante la colaboración conjunta de científicos y tecnólogos de diferentes áreas, así como de empresas involucradas en el sector, las cuales deben establecer los objetivos y alcances requeridos para hacer este tipo de procesos viables.

Las iniciativas públicas aplicadas de forma individual hasta el momento, no han sido capaces de alcanzar las expectativas generadas para el fomento del cultivo de microalgas, prueba de ello es que tras años de investigaciones no se han logrado desarrollos industriales significativos. A su vez, resulta difícil para el sector privado desarrollarlo individualmente sin apoyo público, por lo que es prioritario y requisito fundamental que exista una colaboración y coordinación entre organismos públicos y privados para alcanzar el éxito, y en concreto del sistema ciencia-tecnología-empresa.

Actualmente resulta complejo establecer objetivos concretos en cuanto a producciones para los biocombustibles de microalgas, dada la inmadurez tecnológica del sector. Las únicas estimaciones realizadas hasta la fecha son teóricas, en base a datos de laboratorio y de pequeñas instalaciones piloto. De hecho, no está aún demostrada la viabilidad técnico-económica a gran escala, lo que pone de manifiesto la importancia de desarrollar instalaciones pre-industriales. Una vez alcanzado este desarrollo, extrapolar de forma fiable los resultados obtenidos y decidir el sistema de explotación de esta posible nueva fuente de energía.

La investigación debe permitir el desarrollo de módulos industriales y de sistemas de cultivo escalables que permitan conseguir producciones sostenibles a gran escala.

Biomasa

La utilización de biomasa microalgal como fuente de energía puede contribuir a sustituir la utilización de los combustibles fósiles, lo que daría mayor seguridad energética nacional con una diversificación más amplia de las fuentes de energía.

La biomasa microalgal, al ser una fuente de energía renovable puede ayudar a mitigar el cambio climático, siempre y cuando se produzca de manera sostenible.

El papel que juegan las microalgas para la producción de biomasa, obtención de aceite y producción de biodiesel (biocombustible) es importante, su participación será a largo plazo, puesto que este sector se encuentra en la fase de investigación y desarrollo tecnológico.

A través de una investigación integrada (investigación, desarrollo y empresas) será posible un avance firme en la obtención de aceite y producción de biocombustibles a partir de la biomasa de microalgas.

La producción de biomasa de microalgas con fines energéticos es hoy en día una realidad científica, con un gran potencial que aún debe ser investigada y desarrollada para poder convertirse en una realidad industrial.

Mediante una investigación integrada que conecte la escala de laboratorio con la de planta piloto e industrial, con la participación de grupos de investigación y empresas, será posible un avance firme en la obtención de biomasa, obtención de aceites y de la producción de biocombustibles

Tecnologías de cosechado

El problema de la producción de microalgas para la obtención de biomasa no es tanto la producción sino el cosechado, debido a que el cultivo a densidades bajas es costoso en equipos y energía, especialmente si la tecnología de cosechado es por centrifugación, la cual a grandes volúmenes resulta inviable.

Bibliografía

Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, J. P., Torres, E. & Herrero, C. 1995. Microalgas: Cultivo y aplicación. Laboratorio de microbiología. Depto. de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. Servicio de Publicaciones. Universidad de la Coruña. España. 210 pp.

Abalde, J. & Herrero, C. 2004. Microalgas en acuicultura: calidad nutricional. ALGAS Boletín de la Sociedad Española de Ficología. Universidad de Coruña. No. 32. ISSN: 1695-8160. 16-18.

Aguirre, R. N., Palacio, B. J., Correa, O. I. & Atilano, H. E. 2007. Ensayos de bioestimulación algal con diferentes relaciones nitrógeno: fósforo, bajo condiciones de laboratorio. Revista de Ingenierías, Universidad de Medellín Volumen 6, No. 11. 11-21.

Albarracín, I. 2007. La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. Microalgas: Potenciales productoras de biodiesel. XV Simposio Electrónico Internacional. Centro de las Energías. 1-16.

Al-Zuhair, S. 2007. Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 1: 57-66.

Andrade, D. R., Torres, R., Montes, J. E. & Fernández, C. A. 2006. Obtención de harina a partir del cultivo de *Chlorella vulgaris* y su análisis proteico. Universidad de Córdoba. Departamento de Ingeniería de Alimentos. Ciénega de Oro. pp. 50-57.

Arredondo, B. O & Vázquez-Duhalt, R. 1991. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo.* 17: 99-111.

Baldía, S., T. Nishijima & Y. Hata. 1991. Effects of physico-chemical factors and nutrients on the growth of *Spirulina platensis* isolated from Lake Kojima, Japan. *Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci.* 57: 481-490.

Barsanti, L. & Gualtieri, P. 2006. Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. CRC. Presbook. Tay & Francis. 301 pp.

Barraza-Guardado, R., Cortés-Altamirano, R., & Sierra-Beltrán, A. 2004. Marine die-offs form *Chatonella marina* and Ch. cf. *Ovata* in Kun Kaak Bay, Sonora in the Gulf of California. *Harmful Algae News*, 25:78.

Becker, E. W. 1986. Nutritional properties of microalgae: Potencial and constraints. En: *Handbook of microalgal mass culture*. Richmond, A. (ed.) CRC Press, Florida. pp 339-419.

Becker, E. W. 1995. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press. 18, 24.

Beljanin, V. & A. Trenkenšu. 1977. Growth and spectrophotometric characteristics of the blue-green alga *Synechococcus elongatus* under different temperature and light conditions. *Arch. Hydrobiol.* 51, Algol. Studies 18: 46-66.

Belter, P. A., Cusler, E. L. & Hu, W. S. 1988. *Bioseparations: Downstream processing for biotechnology*. John Wiley & Sons. pp 587.

Ben-Amotz, A. 1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz & Avron (Volvocales, Chlorophyta). *J. Plant Physiol.* 1131: 479-487.

Bioplat. 2006. *La energía de las algas. Presente y Futuro*. Plataforma Tecnológica Española de la Biomasa. España.

Bold, C. H., Wynne, J. M. 1985. *Introduction to the Algae. Structure and Reproduction*. Second edition. Prentice-Hall. New Jersey, USA. 720 pp.

Bousquets, L. J., Luna, I. 1994. *Taxonomía biológica*. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Fondo de Cultura Económica. México. 626 pp.

BP Statistical Review of World Energy (2008). www.bp.com/liveassets/bp_internet/glob_albp/globalbp_uk_english/reports_and_publications/statistical_energy_review_2008/STAGING/local_assets/downloads/pdf/statistical_review_of_world_energy_full_review_2008.pdf.

Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Garland, C. D. 1989. *Nutritional aspects of microalgae used in mariculture, a literature review*. CSIRO Marine Laboratories, Report 205. Australia.

Castillo, J. 1978. *Proyecto Peruano-Alemán. Microalgas para consumo humano*. Informe Técnico: Estación Planta Piloto Sausal. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. 53 pp.

CIA World Factbook (2009) www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook.

Cerutti, M. O. 2006. *La Bioenergía en México. Un catalizador del desarrollo sustentable*. México. 119 pp.

Cerutti, M. O., Coralli, F., García, B. C., Riegelhaupt, E., Vega, G. J., Díaz, J. R., Guerrero, P. G., Cecotti, L. 2011. *La Bioenergía en México. Situación actual y perspectivas*. Red Mexicana de Bioenergía, A.C. Cuaderno Temático No. 4. México. 40 pp.

Cohen, Z. 1986. Products from microalgae. *In: Handbook of microalgal mass culture*. Richmond A (ed.) CRC Press. 421-454.

Correa, I. C., Aguirre, N. J., Palacio, J. A., Arroyave, M. P. 2003. Efecto del cromo, mercurio y cadmio sobre el crecimiento poblacional de *Chlorella vulgaris*. Trabajo de grado. Ingeniería Ambiental. Escuela de Ingeniería de Antioqui. Universidad de Antioquia. Medellín.

Curtis, H. 1985. *Biología. Médica Panamericana*. 4ª. Edición. México. 1255 pp.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25:294-306.
Steinbüchel A, Valentin HE. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* 128:219-228.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.

Chisti, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26: 126-131.

Chum, H., Faaij, A., Moreira, J., Berndes, G., Dhamija, P., Dong, H., Gabrielle, B., Goss Eng, A., Lucht, W., Mapako, M., Maser Cerutti, O., McIntyre, T., Minowa, T. & Pingoud, R. 2011. *Bioenergy*. In IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Dawson, N. H., Burlingame, R., Cannons, C. A. 1997. Stable transformation of *Chlorella*: Rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Current Microbiology* Vol. 35. Universidad of Florida. 356-362.

Derner, B. R., Ohse, S., Villela, M., Matos de Carvalho, S., Fett, R. 2006. Microalgas, productos y aplicaciones. *Ciencia Rural*. Santa María. Vol. 36, No. 6:1959-1967.

Diario Oficial de la Federación (DOF). 2008. Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos. México. Gobierno de la República.

Díaz, A. O. 1987. Cultivo y Aislamiento de algas clorófitas en aguas residuales. Tesis Licenciatura. México. 30 pp.

Díaz, R. 2011. Estufas de leña. Cuaderno Temático sobre Bioenergía No. 3. Red Mexicana de Bioenergía A.C. Morelia, Michoacán. México. 32 pp.

Dismukes, G. C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G .M. & Posewitz, M. C. 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 235-240.

Durand-Chastel, H. 1980. Production and use of *Spirulina* in Mexico. In: Shelef, G. and Soeder, C.J. (eds) *Algae Biomass*. Elsevier/north Holland Biomedical Press, Amsterdam. 51-64.

Eisentraeger, A., Dott, W., Klein, J. & Hahn, S. 2003. Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmayer flask growth-inhibition assays. *Ecotox Environ Safety* 54:346–354.

Estrada, G. C. & Islas, S. J. 2010. Energías Alternas: Propuesta de investigación y Desarrollo Tecnológico para México. Academia Mexicana de Ciencias. México.

Fairless, D. 2007. The little shrub that could – maybe. *Nature*, 449: 652-655.

FAO, 2001, Global Forest Resources Assessment 2000: main report. Forestry Paper No. 140, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome. <http://www.fao.org/forestry/fo/fra/main/index.jsp>.

García, M., Quintero, R. & López-Munguía, M. 1993. Biotecnología Alimentaría. Limusa. México. 383-396.

Garibay, H. A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez, M. P. 2009. Biodiesel a partir de microalgas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos. *BioTecnología*. Vol. 13 No. 3. 38-61.

Ge, W., N, Liu., W, Ren., S, Zhou. & Z, Cao. 1995. On the effect of zeolite on photosynthesis intensity of culture water. *Shandong-Fish. Qilu-Yuye* 12(5):7-10.

Gómez, M. 2007. Situación actual de biocombustibles en México. México.

González, B., E, Buitargo. & K, Frontado. 1999. Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura.

González-Longatt, M. F. 2007. Propuesta de una Línea de Investigación en Fuentes Alternas de energía y Generación Distribuida. II Congreso Internacional de Investigación y Posgrado. Caracas, Venezuela.

González, A. M. 2009. Producción de Bioenergía en el Norte de México: Tan lejos y tan cerca... *Frontera Norte*. México. Vol.21.No.41. México.

González, D. A., Kafarov, V. & Guzmán, M. A. 2009. Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *Prospect*. Vol.7. No. 2.

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

Gudin, C., Thepenier, C. 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Adv. Biotech. Proc.* 6:73-110.

Guschina, I. A. & Harwood, J. L. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45: 160-186.

Greenberg, A. E., Clesceri, L. S & Eaton, A. D. 1992. *Standard methods for the examination of water and waste water*, 18th Edition. APHA-AWWA-WEF.

Griffiths, M. J. & Harrison, S. TL. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 21: 493-507.

Hernández, A. G., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez-Saavedra, M. P., Serrano-Carreón, N. L. & Martínez-Jimena, A. 2009. Biodiesel a Partir de Microalgas. *Biotecnología y Bioingeniería.* 13: 38-61.

Hoek, D. V., Mann, G. D. & H, M. H. 1995. *Algae. An Introduction to phycology.* Cambridge university Preess. USA. 623 pp.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621-639.

Huss, V., Frank, C., Hartmann, E., Hirmer, M., Kloboucek, A., Seidel, B., Wenzeler, P. & Kessler, E. 1999. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 35(3):587-598.

Illman, A. M., Scragg, A. H. & Shales, S. W. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microbial Technology* 27:631-635.

Instituto Politécnico Nacional (INP). 2007. Fuentes Alternas de Energía. Premio al Mérito Ecológico. Programa Ambiental del Instituto Politécnico Nacional. México. 2 pp.

Kawaguchi, K. 1980. Microalgae production systems in Asia. In: Shelef, G. and Soeder, C.J. (eds) *Algae Biomass Algae Biomass.* Elsevier/north Holland Biomedical Press, Amsterdam. 25-33.

Konishi, F. 1996. Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* sp against myelo-suppression by 5-fluorouracil cancer immunotherapy, 46:268-274.

- Laliberté, G., Olguin, E. J. & De la Noüe, J. 1997. Mass cultivation and wastewater treatment using *Spirulina*. In: Vonshak, A. (ed) *Spirulina platensis: Physiology, Cell Biology and Biotechnology*. Taylor & Francis Ltd, London.
- Lee, R. E. 1995. *Phycology*. Cambridge. University Press. USA.
- Lee, Y. K. 1997. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J. Appl. Phycol.* 9, 403-411.
- Lee, A. K., Lewis, D. M. & Ashman, P. 2009. Microbial flocculation, a potentially lowcost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J. Appl. Phycol.* 21: 559-567.
- León, M. A. 2010. Estudio de factibilidad técnico, económico y ambiental para la instalación de una biorefinería en México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 78 pp.
- Li, X., Xu, H., Wu, Q. 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 98: 764-771.
- Li, Q., Du, W. & Liu, D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 749-756.
- Liu, B. & Zhao, Z. 2007. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82: 775-780.
- López-Ruiz, J. L., García, G. R. & Ferreira, S. M. A. 1995. Marine microalgae culture: *Chaetoceros gracilis* with zeolitic product ZESTEC-56 and a commercial fertilizer as a nutrient. *Aquacultural Engineering* 14(4):367-372.
- Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J. & Morales, E. 2003. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana Botánica.* 60: 83-89.
- Ma, F. R. & Hanna, M. A. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol* 70: 1-15.
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Mab, L., Chena, X. & Xua, R. 2005. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63:456-462.
- Machado, C. 2010. Situación de los Biocombustibles de Segunda y Tercera Generación en América Latina y Caribe. Organización Latinoamericana de Energía (OLADE) y Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Brasil. 99 pp.

Mandalam, R., Palsson, B. 1998. Elemental Balancing of Biomass and Medium Composition Enhances Growth Capacity in High-Density *Chlorella vulgaris* Cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol.59, No.5. 605-611.

Maseda, A. 2002. La luz modifica la productividad, la composición y el proteoma de microalgas del género *Nannochloropsis*. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España.

Mayfield, P. S., Manuell, L. A., Chen, S., Wu, J., Tran, M., Siefker, D., Muto, M., Marin-Navarro, J. 2007. *Chlamydomonas reinhardtii*. Chloroplasts as protein factories. *Current Opinion Biotechnology*. Vol. 18. Issue 2. 126-133.

Meng, X., Yang, X., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. & Xian, M. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34: 1-5.

Meng, C. X., Wei, W., Su, Z. & Qin, S. 2009. Characterization of carotenoid hydroxylase gene in *Haematococcus pluvialis*. *Indian. J. of Biochem. And Biophysic*. Vol.43. 284-288.

Metzger, P. & Largeau, C. 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 66: 486-496.

Miao, X. L., Wu, Q. Y. 2004. Bio-oil fuel production from microalgae after heterotrophic growth. *Renewable Energy Resources* 4 (116):41-44.

Miao, X. L. & Wu, Q. Y. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Technol*. 97:841-846.

Monthieu, C. 2010. Estudio técnico económico de la extracción de lípidos de las microalgas para la producción de biodiesel. Universidad Pontificia Comillas. España, Madrid.153 pp.

Moreno-Garrido, I., Lubian, M. L. & Soares, M. V. 2000. Influence of Cellular Density on Determination of EC50 in microalgal Growth Inhibition Tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf. Environ. Res. Section B* 47:112-116.

Moreno-Garrido, I., Lubián, M. L & Blasco, J. 2007. Sediment toxicity tests involving immobilized microalgae (*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin). Environmental contaminants and their effects: Links between environmental chemistry and toxicology. *Environment International*. Vol. 33, Issue 4. 481-485.

Morris, H., Quintana, M., Almarales, A. & Hernández, L. 1999. Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y nutrición* 13(2):123-128.

- Noda, K., Yamada, A., Tanaka, K., Hasegawa, T., Okuda, M., Shoyama, Y., Nomoto, K. 1996. A novel glycoprotein obtain from *Chlorella vulgaris* strain CK22 show antimetastatic immunopotential. *Cancer Immunol Immunother.* 45: 313-320.
- Ortega, J., Moronta, R. & Morales, E. 2004. Influencia del acetato sobre el crecimiento y contenido de pigmentos de la microalga *Chlorella sp.* *Ciencia* 12(1):25-31.
- Oswald, W. J. 1988. Microalgae and waste-water treatment. In: Borowitzka, MA y Borowitzka LJ, (eds.) *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. pp 305-328. ISBN: 0-521-32349-5.
- Pulzo, O. & Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:635–48.
- Probst, O. 2006. Taller práctico sobre Bioenergía. Instituto Tecnológico de Monterrey (ITESM). Monterrey, Nuevo León. México.
- Ramos, A. & Salazar, M. 1990. Uso potencial de los cultivos masivos de microalgas. *En: De la Lanza, E.G. y Arredondo, F.J.L. (Comps.). La acuicultura en México: de los conceptos a la producción.* 274-288. Instituto de Biología, U.N.A.M., México.
- Richmond, A. 2004. Biological Principles of Mass Cultivation. In: Richmond, A. (ed) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and applied phycology.* Blackwell Science, UK. pp 125-178. ISBN: 0-632-05953-2.
- Rittmann, B. E. 2008. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 100: 203-212.
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. R. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 100-112.
- Romo, S. 1994. Growth parameters of *Pseudanabaena galeata* Böcher in culture under different light and temperature conditions. *Algol. Studies* 75: 239-248.
- Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Wilkinson, L. & Betenbaugh, M. J. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19:430-436.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O. & Hankamer, B. 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.* 1: 20-43.

Schmidt, J. C. 1999. Efecto de la composición bioquímica de microalgas sobre el valor nutritivo de dos cepas de *Artemia*. Instituto Politécnico Nacional (IPN). Centro Interdisciplinario de Ciencias marinas (CICIMAR). La Paz, Baja California Sur. Tesis de Maestría. 69 pp.

Schvarzer, J. & Tavosnanska, A. 2007. Biocombustibles: Expansión de una industria naciente y posibilidad para Argentina. Documento de Trabajo No. 13. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Económicas. Centro de Estudios de la Situación y Perspectivas de la Argentina (CESPA). 65 pp.

Scragg, A. H., Illman, A. M. & Shales, S. W. 2002. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy* 23:67-73.

Sharma, S. S., Franco, T. J. & Nandini, S. 2008. Effect of algal food (*Chlorella vulgaris*) concentration and inoculation density on the competition among three planktonic Brachionidae (Rotifera: Monogononta). *Hidrobiológica* 18(1 Suplemento): 123-132.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. & Roessler, P. 1998. A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program – biodiesel from algae. *National Renewable Energy Laboratory*, Golden CO; Report NREL/TP-580-24190, 328 p.

Song, D., Fu, J. & Shi, D. 2008. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chin. J. Biotech.* 24: 341-348.

Soto, O. G. 2008. La Ciencia de los materiales en busca de fuentes alternativas de energía. Universidad Autónoma de Nuevo León. Ciencia UANL. Vol. XI. No. 002. 193-195.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Biosciences and Bioengineering* 101:87–96.

Stein, J. R. 1973. Handbook of phycollogical methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, London. 7-24.

Tama, N., Wong, Y. 1996. Ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresour. Technol.* 57. 45-50.

Torres, R. F. & Gómez, M. E. 2006. Energías Renovables para el Desarrollo Sustentable en México. Secretaría de Energía (SENER). México. ISBN:970-9983-07-5. 89 pp.

- Tredici, R. M. 1999. Bioreactors, photo, Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation, vol. 1, in: M.C. Flickinger, S.W. Drew, Editors Wiley, New York. pp. 395–419.
- Tsukada, O., Kawahara, T. & Miyachi, S. 1977. Mass culture of *Chlorella* in Asian countries. In: Mitsui, A., Miyachi, S., San Pietro, A. and Tamura, S. (eds) *Biological Solar Energy Conversion*. Academic Press, New York. 455-471.
- Uribe, E. 1995. Cultivo de Microalgas. Memoria: Curso Interamericano de Biología Marina. Universidad Católica del Norte – Organización de Estados Americanos, Santiago de Chile. 15-17.
- Vega, A. Andrés y P. 2005. Fito. Modelado de la cinética de secado del pimiento rojo (*Capsicum annuum* L.) cv Lamuyo. Revista *Información Tecnológica*. Vol. 16 Nº 6, pp. 3-11. 2005.
- Voltolina, D., Nieves, M. & López-Ruíz, L. J. 1997. Zeolitic products as enrichment for cultures of a marine microalga. *Aquacultural Engineering*. 16:1-5.
- Waltz, E. 2009. Biotech's new gold? *Nat. Biotechnol.* 27: 15-18.
- Webb, K. L. & Chu, F. E. 1983. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. 27-29.
- Wei, X., Xiufeng, L., Jinyi, X. & Qingyu, W. 2008. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:29-36.
- Whyte, J. N. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60:231-241.
- Xiaoling, M. & Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*. Vol. 97. Issue 6. 841-846.
- Yoon, J., Shin, J. & Park, T. 2007. Characterization of factors influencing the growth of *Anabaena variabilis* in a bubble column reactor. *Biores. Technol.* En prensa (disponible en-línea en www.sciencedirect.com).

ANEXO A

TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA LA EVALUACIÓN DE
LA ETAPA EXPERIMENTAL (CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS
CULTIVOS DE MICROALGAS)

Determinación de biomasa (densidad celular)

Conteo celular: Evaluación de la densidad celular (células/ml), siguiendo el método del hemocitómetro, utilizando una cámara de Neubauer.

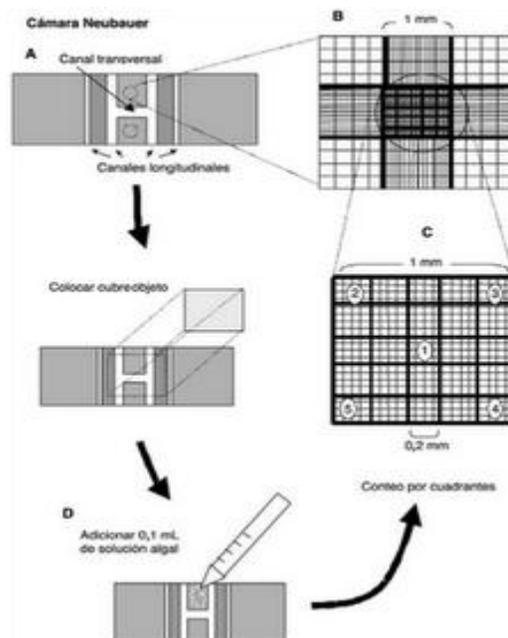
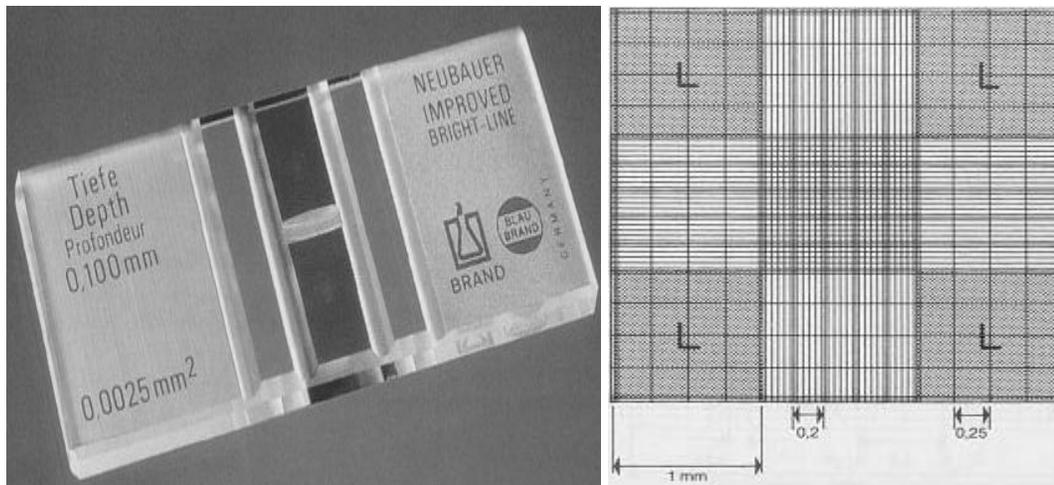


Figura A. Cámara de Neubauer para el conteo celular.

Determinación de peso seco

De acuerdo al Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1992).

Sólidos totales (ST) en mgL^{-1}

Metodología:

- ◆ Limpiar los crisoles o cápsulas de porcelana (3 piezas), con el fin de eliminar todas las materias adheridas a ellos. Secarlos.
- ◆ Marcarlos (utilizar lápiz) en la parte de abajo, con un número o letra.
- ◆ Colocarlos en una estufa a 100°C durante 8 horas o en una mufla a 120°C durante una hora para eliminar la humedad presente.
- ◆ Transferirlos a un desecador durante 45 minutos, con el fin de llevar a peso constante.
- ◆ Pesar en una balanza analítica por triplicado (peso A).
- ◆ Adicionar a los crisoles, un volumen conocido de muestra homogénea, con la ayuda de una pipeta volumétrica o una micropipeta semiautomática.
- ◆ Colocarlos en una estufa a 103°C durante una hora o en una mufla a 120°C durante media hora.
- ◆ Después de secar la muestra, transferirlos a un desecador durante 45 minutos con el fin de llevar a peso constante.
- ◆ Pesar en una balanza analítica por triplicado (peso B).
- ◆ La diferencia de peso entre los crisoles sin muestra y con muestra ya desecada, dan la cantidad de materia sólida total contenida en ésta.
- ◆ Con la siguiente fórmula se calculan los sólidos totales:

$$\text{ST} = (\text{B}-\text{A}) \times 10^6/\text{V}$$

Donde:

ST= Sólidos totales (mg/L)

B= Peso del crisol con la muestra (g).

A= Peso del crisol vacío (g).

V= Volumen de la muestra colocada en el crisol (mL).

ANEXO B

MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS, UTILIZADOS PARA EL CULIVO DE MICROALGAS

Tabla A. Medio Basal de Bold (MBB) tomado de Stein, (1973) para *Chlorella vulgaris*.

Solución	Reactivos	Concentración (mgL ⁻¹)
1	NaNO ₃	250
2	CaCl ₂ .2H ₂ O	25
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	75
4	K ₂ HPO ₄	75
5	KH ₂ PO ₄	175
6	NaCl	25
7	FeSO ₄ .7H ₂ O	4.98
	H ₂ SO ₄	0.001 (ml L ⁻¹)
8	H ₃ BO ₃	11.42
9	E.D.T.A.	50
	KOH	31
10	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.82
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.44
	MoO ₃	0.71
	CuSO ₄ .5H ₂ O	1.57
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.49

Tabla B. Medio Basal de Bold Modificado para *Chlorella protothecoides*.

Solución	Reactivos	Concentración (mgL ⁻¹)
1	(NH ₄) ₂ HPO ₄	20.3
2	CaCl ₂ ·2H ₂ O	25
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	75
4	K ₂ HPO ₄	75
5	KH ₂ PO ₄	175
6	NaCl	25
7	FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.98
	H ₂ SO ₄	0.001 (ml L ⁻¹)
8	H ₃ BO ₃	11.42
9	E.D.T.A.	50
	KOH	31
10	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44
	MoO ₃	0.71
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49

Tabla C. Medio Watanabe para *Chlorella protothecoides*.

Reactivo analítico	Cantidad (gL ⁻¹)
KNO ₃	1.25
K ₂ HPO ₄	1.25
	mgL ⁻¹
MgSO ₄	20
FeSO ₄	20
Solución A5 (traza de metales): gL ⁻¹	1 ml
H ₃ BO ₃	2.18-2.86
MnC ₁₂ .4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22
CUSO ₄ .5H ₂ O	0.079-0.08
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.021-0.039
Co(NO ₃).6H ₂ O	0.0494
H ₂ SO ₄ concentrado	1 ml
Ajustar el pH=8 con 1M NaOH antes de esterilizarse.	

Tabla D. Medio Watanabe con glucosa para *Chlorella protothecoides*.

Reactivo analítico	Cantidad (gL ⁻¹)
KNO ₃	1.25
K ₂ HPO ₄	1.25
	mgL ⁻¹
MgSO ₄	20
FeSO ₄	20
Solución A5 (traza de metales): gL ⁻¹	1 ml
H ₃ BO ₃	2.18-2.86
MnC ₁₂ .4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.22
CUSO ₄ .5H ₂ O	0.079-0,08
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.021-0039
Co(NO ₃).6H ₂ O	0.0494
H ₂ SO ₄ concentrado	1 ml
Ajustar el pH=8 con 1M NaOH antes de esterilizarse.	
Adicionar al medio después de esterilizar, una solución de glucosa (10 y 20 g L ⁻¹) filtrada con una membrana tipo pirinola de 0.2 µm.	

Tabla E. Medio Watanabe (bajo contenido de nitrógeno) para *Chlorella protothecoides*.

Reactivo analítico	Cantidad (mgL ⁻¹)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	203
FeSO ₄	10
	gL ⁻¹
KCl	2.236
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.465
K ₂ HPO ₄	1.361
Ajustar el pH=6 antes de esterilizarse.	

ANEXO C

TABLAS DE DATOS EXPERIMENTALES REGISTRADOS

Tabla F. Valores obtenidos de las cinéticas de crecimiento en los tres sistemas (matraz Erlenmeyer de 1000 mL) evaluados para *Chlorella vulgaris*.

		SISTEMA 1	SISTEMA 2	SISTEMA 3
Fecha	Días	células/ml	células/ml	células/ml
14/06/2010	0	5.00E+04	5.00E+04	5.00E+04
16/06/2010	2	6.13E+06	7.19E+04	5.28E+05
18/06/2010	4	1.14E+06	1.48E+06	1.70E+06
21/06/2010	7	4.35E+06	3.70E+06	3.00E+06
22/06/2010	8	5.36E+06	4.15E+06	4.10E+06
23/06/2010	9	5.70E+06	4.65E+06	7.25E+06
24/06/2010	10	7.50E+06	7.05E+06	1.07E+07
25/06/2010	11	9.90E+06	1.99E+07	1.07E+07
27/06/2010	13	1.37E+07	3.14E+07	2.50E+07
28/06/2010	14	2.20E+07	2.60E+07	2.03E+07
29/06/2010	15	2.13E+07	2.68E+07	2.20E+07
30/06/2010	16	2.25E+07	2.43E+07	2.10E+07
01/07/2010	17	2.40E+07	2.48E+07	2.08E+07
02/07/2010	18	2.55E+07	2.43E+07	2.20E+07

Tabla G. Valores obtenidos de las cinéticas de crecimiento en los tres sistemas evaluados (carboy) para *Chlorella vulgaris*.

Fecha	Días	CARBOY 1	CARBOY 2	CARBOY 3
		células/ml	células/ml	células/ml
03/05/2011	0	1.00E+05	1.00E+05	1.00E+05
09/05/2011	6	1.41E+05	1.34E+05	1.74E+05
10/05/2011	7	4.44E+05	4.79E+05	8.93E+05
11/05/2011	8	7.34E+05	5.46E+05	1.06E+06
12/05/2011	9	2.22E+06	1.52E+06	2.70E+06
13/05/2011	10	6.61E+06	4.15E+06	5.53E+06
16/05/2011	13	7.48E+06	4.13E+06	7.63E+06
17/05/2011	14	8.13E+06	5.08E+06	8.24E+06
18/05/2011	15	9.21E+06	6.00E+06	9.80E+06
19/05/2011	16	1.45E+07	1.11E+07	1.32E+07
20/05/2011	17	1.76E+07	1.26E+07	1.31E+07
23/05/2011	20	2.00E+07	1.20E+07	1.39E+07
24/05/2011	21	1.97E+07	1.43E+07	1.48E+07
25/05/2011	22	2.09E+07	1.58E+07	1.65E+07
26/05/2011	23	2.95E+07	1.80E+07	1.55E+07
27/05/2011	24	2.84E+07	1.89E+07	1.73E+07
30/05/2011	27	2.72E+07	1.23E+07	1.28E+07
31/05/2011	28	2.50E+07	1.18E+07	1.29E+07
01/06/2011	29	2.44E+07	1.16E+07	1.24E+07
02/06/2011	30	2.37E+07	6.75E+06	1.29E+07
03/06/2011	31	2.42E+07	6.53E+06	1.31E+07

Tabla H. Valores registrados del comportamiento del pH durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.

Fecha	Días	pH (unidades de pH)		
		CARBOY 1	CARBOY 2	CARBOY 3
03/05/2011	0	6.75	6.84	6.91
09/05/2011	6	6.75	6.84	6.91
10/05/2011	7	6.78	6.78	6.95
11/05/2011	8	6.89	6.86	6.96
12/05/2011	9	7.07	7.05	7.20
13/05/2011	10	7.07	7.09	7.13
16/05/2011	13	7.12	7.21	7.30
17/05/2011	14	7.09	7.21	7.29
18/05/2011	15	7.32	7.38	7.51
19/05/2011	16	7.35	7.45	7.57
20/05/2011	17	7.46	7.46	7.65
23/05/2011	20	7.43	7.36	7.69
24/05/2011	21	7.54	7.60	7.72
25/05/2011	22	7.98	8.16	8.29
26/05/2011	23	8.00	8.03	8.26
27/05/2011	24	7.95	8.06	8.13
30/05/2011	27	8.10	7.99	8.22
01/06/2011	29	8.48	8.50	8.92
02/06/2011	30	8.67	8.68	9.05
03/06/2011	31	8.68	8.68	9.02

Tabla I. Valores obtenidos de las cinéticas de crecimiento en los tres sistemas evaluados (carboy) para *Chlorella protothecoides*.

		CARBOY 1	CARBOY 2	CARBOY 3
Fecha	Días	células/ml	células/ml	células/ml
29/07/2011	0	1.00E+05	1.00E+05	1.00E+05
02/08/2011	4	1.68E+05	2.11E+05	1.90E+05
03/08/2011	5	3.20E+05	3.09E+05	4.40E+05
04/08/2011	6	1.40E+06	2.03E+06	1.78E+06
05/08/2011	7	3.05E+06	2.40E+06	2.66E+06
08/08/2011	10	3.11E+06	2.43E+06	2.75E+06
09/08/2011	11	4.39E+06	2.86E+06	3.51E+06
10/08/2011	12	6.51E+06	5.28E+06	6.00E+06
11/08/2011	13	1.09E+07	7.58E+06	7.13E+06
12/08/2011	14	1.20E+07	1.03E+07	1.04E+07
15/08/2011	17	1.28E+07	1.00E+07	9.76E+06
16/08/2011	18	1.31E+07	9.97E+06	9.72E+06
17/08/2011	19	1.33E+07	1.27E+07	1.04E+07
18/08/2011	20	1.36E+07	1.39E+07	1.10E+07
19/08/2011	21	1.50E+07	1.34E+07	1.10E+07
22/08/2011	24	1.48E+07	1.31E+07	1.08E+07
23/08/2011	25	1.49E+07	1.26E+07	1.05E+07
24/08/2011	26	1.50E+07	1.30E+07	1.10E+07

Tabla J. Valores registrados del comportamiento del pH durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.

Fecha	Días	pH (unidades de pH)		
		CARBOY 1	CARBOY 2	CARBOY 3
29/07/2011	0	6.89	6.91	6.89
02/08/2011	4	7.32	7.32	7.20
03/08/2011	5	7.40	7.33	7.19
04/08/2011	6	7.53	7.42	7.39
05/08/2011	7	7.58	7.43	7.39
08/08/2011	10	7.52	7.43	7.46
09/08/2011	11	7.69	7.56	7.52
10/08/2011	12	7.72	7.74	7.66
11/08/2011	13	8.00	7.84	7.86
12/08/2011	14	8.04	7.91	7.98
15/08/2011	17	8.34	8.16	8.02
16/08/2011	18	8.31	8.16	8.24
17/08/2011	19	8.46	8.49	8.58
18/08/2011	20	8.75	8.56	8.63
19/08/2011	21	8.76	8.84	8.92
22/08/2011	24	8.90	8.91	8.75
23/08/2011	25	9.01	9.00	8.78
24/08/2011	26	9.26	9.50	8.87

Tabla K. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales (ST) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.

Fecha	Días	CARBOY 1	CARBOY 2	CARBOY 3
03/08/2011	5	973.33	883.33	786.67
04/08/2011	6	980.00	946.67	750.00
08/08/2011	10	1003.33	1043.33	836.67
10/08/2011	12	1066.67	996.67	876.67
11/08/2011	13	1113.33	1093.33	940.00
12/08/2011	14	1176.67	1176.67	910.00
16/08/2011	18	1153.33	1206.67	956.67
18/08/2011	20	913.33	826.67	983.33
19/08/2011	21	933.33	880.00	1066.67
23/08/2011	25	916.67	890.00	1056.67

Tabla L. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales volátiles (STV) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.

Fecha	Días	CARBOY 1	CARBOY 2	CARBOY 3
03/08/2011	5	440.00	360.00	300.00
04/08/2011	6	520.00	380.00	330.00
08/08/2011	10	510.00	486.67	360.00
10/08/2011	12	563.33	450.00	343.33
11/08/2011	13	566.67	506.67	460.00
12/08/2011	14	676.67	593.33	366.67
16/08/2011	18	753.33	603.33	413.33
18/08/2011	20	490.00	326.67	443.33
19/08/2011	21	490.00	306.67	490.00
23/08/2011	25	453.33	316.67	480.00

Tabla M. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales fijos (STF) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella vulgaris*.

Fecha	Días	CARBOY 1	CARBOY 2	CARBOY 3
03/08/2011	5	533.33	523.33	486.67
04/08/2011	6	460.00	566.67	420.00
08/08/2011	10	493.33	556.67	476.67
10/08/2011	12	503.33	546.67	533.33
11/08/2011	13	546.67	586.67	480.00
12/08/2011	14	500.00	583.33	543.33
16/08/2011	18	400.00	603.33	543.33
18/08/2011	20	423.33	500.00	540.00
19/08/2011	21	443.33	573.33	576.67
23/08/2011	25	463.33	573.33	576.67

Tabla N. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales (ST) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.

Fecha	Días	CARBOY 1	CARBOY 2	CARBOY 3
03/08/2011	5	796.67	786.67	770.00
04/08/2011	6	766.67	763.33	786.67
08/08/2011	10	840.00	800.00	823.33
10/08/2011	12	873.33	830.00	906.67
11/08/2011	13	896.67	840.00	906.67
12/08/2011	14	943.33	866.67	953.33
16/08/2011	18	970.00	896.67	950.00
18/08/2011	20	1033.33	963.33	976.67
19/08/2011	21	1060.00	973.33	1000.00
23/08/2011	25	1110.00	986.67	1070.00

Tabla Ñ. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales volátiles (STV) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.

Fecha	Días	CARBOY 1	CARBOY 2	CARBOY 3
03/08/2011	5	316.67	209.00	196.67
04/08/2011	6	310.00	213.33	213.33
08/08/2011	10	326.67	213.33	220.00
10/08/2011	12	336.67	216.67	290.00
11/08/2011	13	356.67	273.33	270.00
12/08/2011	14	400.00	303.33	360.00
16/08/2011	18	436.67	313.33	356.67
18/08/2011	20	480.00	380.00	360.00
19/08/2011	21	466.67	376.67	356.67
23/08/2011	25	500.00	390.00	360.00

Tabla O. Valores registrados del comportamiento de los sólidos totales fijos (STF) durante toda la fase de experimentación para *Chlorella protothecoides*.

Fecha	Días	CARBOY 1	CARBOY 2	CARBOY 3
03/08/2011	5	480.00	577.67	573.33
04/08/2011	6	456.67	550.00	573.33
08/08/2011	10	513.33	586.67	603.33
10/08/2011	12	536.67	613.33	616.67
11/08/2011	13	540.00	566.67	636.67
12/08/2011	14	543.00	563.33	593.33
16/08/2011	18	533.33	583.33	593.33
18/08/2011	20	553.33	583.33	616.67
19/08/2011	21	593.33	596.67	643.33
23/08/2011	25	610.00	596.67	710.00

ANEXO D

TABLAS DEL PORCENTAJE EN PESO Y ESPECTROGRAMAS