Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable.

Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. en un fotobiorreactor acoplado a un sistema de recuperación de biomasa.

Tesis que presenta:

I.Q.ELDA RUFINA MAY CUA

En opción al título de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México Enero, 2015

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD.

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis en las Unidades y laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven de lo correspondiente a dicha información, le pertenece patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal de Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Mérida, Yucatán

Enero de 2015

Elda R. May Cuá.

El trabajo de tesis titulado "Cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp. en un fotobiorreactor acoplado a un sistema de recuperación de biomasa", fue desarrollado por la estudiante Elda R. May Cuá en el laboratorio USF15 de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Felipe Barahona Pérez y la Dra. Liliana María Alzate Gaviria, en el programa de Maestría en Ciencias en Energía Renovable de este Centro.

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director Académico
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco de manera sincera a mi Director de tesis, el Dr. Luis Felipe Barahona Pérez, por haber confiado en mí, y darme todo su apoyo y ayuda a lo largo del desarrollo de la tesis. Su experiencia y conocimiento brindado han sido un aporte invaluable.

A mi Codirectora de tesis, Dra. Liliana María Alzate Gaviria, por sus aportes relevantes, críticas, comentarios y sugerencias realizadas durante el desarrollo de esta investigación y sobre todo por alentarme en mi trabajo de tesis.

Al Comité Tutoral, Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda y Dr. Rodrigo Tarkus Patiño Díaz, por sus valiosos comentarios, su atención, tiempo y disposición que me brindaron a lo largo de este proyecto de tesis, en especial a la Dra. Ruby Valdez por su asesoramiento, consejos, críticas y apoyo en todo momento, muchas gracias por alentarme y guiarme.

A los revisores Dra. Virginia Herrera y a la Dra. M. Antonia Luna por sus comentarios, tiempo y disposición brindada.

A la QFB Silvia López Adrián, por la amable donación de la microalga *Scenedesmus* sp.

A la Unidad de Energía Renovable y al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., por las instalaciones y apoyo prestados para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 345957) otorgada para los estudios de maestría.

A la QI Tanit Toledano Thompson y M en C Jorge Domínguez Maldonado, por el apoyo técnico brindado en esta investigación. Gracias por su amabilidad, disposición y tiempo brindado, pero sobre todo por su amistad en el transcurso de mi maestría.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de la Unidad de Energía Renovable, Arely Briceño, Katia Ancona, Muriel González, Francisco del Río, Isaura España, Gerardo Cámara, Carlos Hernández, Guadalupe Sánchez, Harvey Nanduca, Ángel Hernández y Karyl Guzmán. Gracias por compartir muchos momentos inolvidables que guardaré por siempre en mi corazón. Ustedes han enriquecido mi vida con su amistad, cariño y alegría.

DEDICATORIA.

Esta tesis la dedico con mucho amor y cariño a mis abuelos, Elda María Vera Carrillo y Eusebio May, a mis padres María Teresita Cuá Pat y Jorge Enrique May Vera, a mi hermana Teresa de Jesús May Cuá, quienes han sido la fuente de mi inspiración y motivación para desarrollarme profesionalmente. Por ustedes he logrado una meta más en mi vida, por ello estoy eternamente agradecida.

CONTENIDO.

INTRODUCCIÓN 1
CAPITULO 1 4
ANTECEDENTES 4
1.1.-Las microalgas como una fuente para la producción de biodiesel 4
1.2.-*Scenedesmus* sp. 7
1.3.-Sistemas de cultivo 8
1.3.1.-Sistemas abiertos 9
1.3.2.-Sistemas cerrados 10
1.3.2.1.-Fotobiorreactores 10
a) Tubulares 10
b) De placa plana 12
c) De columna 13
1.4.-Parámetros de crecimiento de las microalgas en fotobiorreactores 14
1.5.-Produccion de biomasa microalgal 17
1.5.1.- Métodos de cosecha 19
1.5.2.-Métodos de secado 22
1.6.-Justificación 25
1.7.-Hipótesis 25
1.8.-Objetivos 3
1.8.1.-Objetivo general. 3
1.8.2.-Objetivos particulares. 3
CAPÍTULO 2 26
MATERIALES Y MÉTODOS 26
2.1.-Estrategia experimental. 26
2.2.-Material biológico 27
2.3.-Medio de cultivo 27
2.4.-Cultivo de la microalga 27
2.5.-Conteo celular 27
2.6.- Curva de crecimiento 28
2.7.-Esterilizacion del fotobiorreactor de 1 L 28
2.8.-Limitación de Nitrógeno 29
2.9.-Pruebas de intensidad luminosa 29
2.10.-Recolección y productividad de biomasa 29

2.11.-Deshidratación de la biomasa microalgal. 30
2.12.-Extracción de lípidos..... 30
2.13.-Cromatografía de capa fina 30
2.14.-Transesterificación..... 31
2.15.-Análisis por cromatografía de gases. 31
2.16.- Fotobiorreactor escala laboratorio de 1L 31
2.16.1.-Aireación /Agitación 33
2.16.2.-Iluminación 33
2.17.-Diseño de la era de secado 33
2.18.-Eficiencia del equipo..... 34
2.19.-Análisis estadístico..... 35
CAPÍTULO 3 36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 36
3.1.- Curva de crecimiento en matraces Celstir de 250 mL 36
3.2.-Pruebas de limitación de Nitrógeno en matraces Celstir de 250 mL. 38
3.2.1.-Produccion de biomasa en matraces Celstir de 250 mL 40
3.2.2.-Contenido lipídico en matraces Celstir de 250 mL 41
3.2.3.-Perfil lipídico en matraces Celstir de 250 mL..... 43
3.3.-Pruebas de intensidad luminosa en matraces Celstir de 250 mL 44
3.3.1.-Biomasa seca..... 44
3.3.2.-Contenido lipídico..... 45
3.3.3.-Perfil lipídico. 47
3.4.-Construcción y montaje del fotobiorreactor tronco-cónico. 48
3.4.1.-Pruebas de aireación del reactor..... 50
3.4.2. Curva de crecimiento del fotobiorreactor con difusor con cinta Thermofit. 52
3.4.3.-Producción de biomasa. 54
3.4.4.-Contenido lipídico..... 57
3.4.5.-Perfil lipídico. 59
3.5.-Construcción y montaje de la era de secado. 61
3.5.1.-Eficiencia del equipo y filtro de retención (tela black out)..... 62
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS. 65
BIBLIOGRAFÍA..... 67
ANEXO I. 80
ANEXO II. 83
ANEXO III 84

ANEXO IV..... 93
ANEXO V..... 95

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.1.- Microalgas más abundantes y sus productos de almacenamiento..... 4
Tabla 1.2.- Contenido de lípidos y productividad de varias especies de microalgas. 5
Tabla 1.3.-Ventajas, desventajas y desafios de la biomasa microalgal 6
Tabla 1.4.- Tipos de metabolismo en las microalgas en función a su tipo de cultivo. 13
Tabla 1.5.- Microalgas tolerantes al dióxido de carbono..... 15
Tabla 1.6.-Floculantes utilizados para la cosecha de microalgas. 84
Tabla 1.7.-Comparacion de cosechas por los métodos de flotación..... 84
Tabla 1.8.-Comparacion de la cosecha de microalgas por métodos de sedimentación por gravedad 85
Tabla 1.9.-Dispositivos de cosecha a través de filtros a presión 85
Tabla 1.10.-Dispositivos de cosecha a través de filtros a vacío 86
Tabla 3.1.- Perfiles lipídicos en matraces Celstir de 250 mL..... 43
Tabla 3.2.- Perfil de lípidos a diferentes intensidades luminosas..... 47
Tabla 3.3.-Perfiles lipídicos del fotobiorreactor tronco-cónico..... 60
Tabla 3.4.-Humedad inicial de la biomasa microalgal. 93
Tabla 3.5.-Humedad final de la biomasa microalgal..... 93
Tabla 3.6.-Comparación de secado..... 94
Tabla 3.7.-Eficiencia de filtro..... 95

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.1.-*Scenedesmus* sp……...6
Figura 1.2.-Estanques abiertos……...8
Figura 1.3.-Fotobiorreactor tubular…..…….…...10
Figura 1.4.-Fotobiorreactor placa plana……...11
Figura 1.5.-Fotobiorreactor de columna……...…….……..13
Figura 1.6.-Esquema de producción de biodiesel…….……...17
Figura 2.1.-Estrategia Experimental……....25
Figura 2.2.-Cámara Neubauer…….....27
Figura 2.3.-Diseño experimental……...……...31
Figura 2.4.-Modelo de bomba……..32
Figura 2.5.-Montaje de lámparas……...……..32
Figura 2.6.-Dimensiones de la Era de secado……..33
Figura 3.1.-Matraz Celstir de 250 mL. 36
Figura 3.2.-Curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. en matraces Celstir de 250 mL. 37
Figura 3.3.-Concentración celular de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas. 39
Figura 3.4.-Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas. 40
Figura 3.5.-Producción lipídica de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas. 41
Figura 3.6.-Contenido lipídico (%) de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representa diferencias significativas. 42
Figura 3.7.-Producción de biomasa seca de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo diferentes intensidades lumínicas. Letras diferentes representan diferencias significativas. 45
Figura 3.8.-Producción lipídica de la microalga *Scenedesmus* sp., en medio TAP bajo diferentes intensidades lumínicas. Letras diferentes representan diferencias significativas.46
Figura 3.9.-Rendimiento lipídico de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo diferentes intensidades lumínicas. Letras diferentes representan diferencias significativas.46
Figura 3.10.- Fotobiorreactor de 1L 48
Figura 3 11.- Vista de superior del fotobiorreactor 48
Figura 3.12.-Vista inferior del fotobiorreactor 49
Figura 3.13.-Montaje del fotobiorreactor. A) inicio de la prueba, B) después de 2 días de cultivo se observa una alta contaminación. 49
Figura 3.14.-Difusores empleados en este trabajo. A) tipo piedra porosa sin Thermofit, B) piedra porosa con Thermofit, C) Difusor de HPLC. 50
Figura 3 15. Fotobiorreactores en pruebas de aireación. 51
Figura 3.16.-Curvas de crecimiento utilizando tres configuraciones de difusores de aire. . 51
Figura 3.17.-Curva de crecimiento del Fotobiorreactor Tronco-Cónico empleando un difusor de piedra porosa con cinta Thermofit. 53

Figura 3.18.-Producción de biomasa seca de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo crecimiento rico en nutrientes. Letras diferentes representan diferencias significativas. 54
Figura 3.19.-Producción de biomasa seca de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas. 55
Figura 3.20.-Comparativa de la productividad de biomasa seca de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo crecimiento rico en nutrientes. Letras diferentes representan diferencias significativas. 56
Figura 3.21.-Comparativa de la productividad de biomasa seca de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo limitación de nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas. 56
Figura 3.22.-Producción de extracto lipídico de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo crecimiento rico en nutrientes. Letras diferentes representan diferencias significativas. 57
Figura 3.23.-Producción de extracto lipídico de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas. 57
Figura 3.24.-Comparativa de la productividad del extracto lipídico de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo crecimiento rico en nutrientes. Letras diferentes representan diferencias significativas. 57
Figura 3.25.-Comparativa de la productividad del extracto lipídico de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas. 58
Figura 3.26.-Rendimiento lipídico de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo limitación de Nitrógeno y crecimiento rico en nutrientes. Letras diferentes representan diferencias significativas. 59
Figura 3.27.-A) Era de secado escala laboratorio; B) Vista superior del filtro de retención en la era de secado. 62
Figura 3.28 Filtro de retención de biomasa. A) Filtro con biomasa después del secado; B) Biomasa recuperada del filtro; C) Filtro al final de la recuperación de biomasa. 64
Figura 3.29.-Filtro de retención después de la cosecha. 64

RESUMEN.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que recientemente están siendo estudiados debido a las grandes cantidades de productos como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, pigmentos y enzimas que pueden obtenerse de ellas. Sin embargo, para el cultivo de las microalgas es necesario el diseño de fotobiorreactores que sean fácilmente escalables, junto con sistemas de cosecha y secado económicamente viables a escala industrial.

En el presente trabajo de investigación se cultivó la microalga *Scenedesmus* sp. para la producción de lípidos en matraces tipo Celstir de 250 mL y luego se diseñó y construyó un sistema de cultivo y cosecha constituido por un fotobiorreactor tronco-cónico de 1 L y una era de secado de la biomasa colectada.

La densidad celular máxima obtenida en el fotobiorreactor tronco-cónico fue de 23.47 x 10^6 células·mL^{-1}, el doble de lo obtenido en los matraces Celstir. La producción de biomasa en el fotobiorreactor fue de 2.0084 g·L^{-1} con una productividad de 266.24 mg·$L^{-1}d^{-1}$ obtenida a los 9 días de limitación de Nitrógeno. La producción de lípidos fue de 916. 24 mg·L^{-1}, con una productividad de 137.51 mg ·$L^{-1}d^{-1}$. El contenido lipídico promedio obtenido fue de 43 % (en base a peso seco de la biomasa).

El perfil lipídico obtenido al final de la fase exponencial [C14:0 (37.82%), C16:0 (38.32%), C18:0 (2.40 %) y C18:1 (21.46%)] mejoró cuando se aplicó la limitación de Nitrógeno por 9 días [C14:0 (3.04 %), C16:0 (35.52%), C18:0 (42.50%), C18:1 (14.30%), C18:2 (4.63%)] ya que este perfil se ajusta a las tres principales características para producir un biodiesel de calidad: índice de cetano, estabilidad oxidativa y flujo en frío.

El filtro de retención, tela black out, empleado para la recuperación de la biomasa microalgal de la era de secado demostró una eficiencia del 86.85 % y la era de secado como método para la deshidratación de la biomasa presentó una eficiencia de secado del 92.18%, con un tiempo de retención de 3-4 días.

ABSTRACT.

Microalgae are photosynthetic microorganisms that are being studied due to the important number of products that they produce, such as proteins, lipids, carbohydrates, vitamins, pigments and enzymes. However, the design of easily scalable photobioreactors together with less energy demanding methods of harvesting and drying are necessary in order to render microalgae culturing technically and economically viable at industrial scale.

In the present work, the microalga *Scenedesmus* sp. was cultivated for lipid production in 250 mL Celstir flasks. Then, a cultivation and harvest system consisting in a 1 L photobioreactor and a sludge dryer bed was designed and built.

The highest cell density obtained in the photobioreactor was 23.47 x 10^6 cells·mL^{-1}, which doubled that obtained with the Celstir flasks. Biomass production in the photobioreactor was 2.0084 g·L^{-1} and a productivity of 266.24 mg·L^{-1}·d^{-1} was obtained after 9 days of Nitrogen limitation. Lipid production was 916.24 mg·L^{-1}, with a productivity of 137.51 mg·L^{-1}·d^{-1}. Lipid content was 43% (w/w dry biomass weight).

Lipid profile at the end of exponential growth [C14:0 (37.82%), C16:0 (38.32%), C18:0 (2.40%) and C18:1 (21.46%)] improved after 9 days of Nitrogen limitation [C14:0 (3.04%), C16:0 (35.52%), C18:0 (42.50%), C18:1 (14.30%), C18:2 (4.63%)] meeting the standards for three main characteristics of biodiesel: cetane index, oxidative stability and cold flow.

The biomass retention filter, “black out” fabric, used for microalgal biomass recovery exhibited 86.85% efficiency and with a retention time of 3-4 days, the sludge dryer bed attained an efficiency of 92.18%

INTRODUCCIÓN

La ASTM (American Society for Testing and Material Standard) define al biodiesel como ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables, como son los aceites vegetales o grasas de animales, y que se emplean en motores de ignición. En la actualidad se promueve su producción y aplicación como sustituto de los combustibles a base de petróleo en países como EUA, Francia, Alemania, Italia, Suecia, España, Reino Unido y Malasia [1, 2].

Para el desarrollo del biodiesel es necesaria la búsqueda de materias primas que presenten altos rendimientos en aceite. Entre las primeras en ser explotadas encontramos la colza, soja, y el girasol, estas son denominadas de primera generación. Sin embargo, fue necesario el empleo de fuentes que no compitan con los cultivos destinados a la alimentación, surgiendo de esta manera las llamadas de segunda generación, entre las que se encuentran a la *Jatropha*, *Mahua*, *Jojoba*, palma aceitera, semillas de tabaco, entre otras. El problema que presentan ambas generaciones es el uso de amplias extensiones de tierras cultivables para su producción y las altas concentraciones de gases de efecto invernadero que son emitidas durante su procesamiento. Por lo tanto, una solución de gran potencial son los cultivos de microalgas denominados de tercera generación. Entre las ventajas que éstas presentan podemos mencionar su rápido crecimiento, alto contenido de lípidos (con una capacidad productiva 50 veces mayor en comparación con las plantas terrestres), poseen un contenido lipídico entre 1 y 85 % con respecto a su peso seco y no compiten con cultivos alimenticios, además de que no requieren grandes extensiones de tierra, lo que les confiere un alto potencial como materia prima para la producción de biodiesel [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

Para el cultivo y producción de biodiesel a partir de biomasa microalgal, es necesario seleccionar la cepa que posea las características idóneas para un fácil cultivo y una alta acumulación de lípidos. De igual manera, son preferibles los sistemas de cultivo que presenten un control adecuado de factores, como lo son el pH, la temperatura, agitación, iluminación, entre otros. El cultivo a gran escala de estos microorganismos se realiza en dos tipos de sistemas denominados: estanques abiertos y fotobiorreactores cerrados. Los

primeros presentan la ventaja de ser más fáciles de construir y operar; sin embargo, exhiben una amplia gama de desventajas, entre las que podemos mencionar: las grandes extensiones de tierras que son requeridas para su empleo; la alta contaminación que presentan los cultivos; la dificultad para monitorear de manera apropiada los factores como: temperatura, intensidad luminosa, agitación, transferencia de gases, pH, por lo que solamente pueden ser empleados para un número limitado de especies. Todo esto conllevó al desarrollo de los fotobiorreactores, los cuales son sistemas diseñados para poder mantener un control adecuado de los diferentes parámetros de cultivo de estas especies; sin embargo, también presentan ciertas desventajas como son las grandes inversiones en el mantenimiento y construcción del equipo, asimismo dependiendo del tipo de material del cual son diseñados presentan una eficiencia reducida de la penetración de la luz en el cultivo. Dentro de este grupo de fotobiorreactores, los de columna de burbujeo son los más empleados debido a su facilidad a la hora de escalar los diseños, presentan una mejor hidrodinámica y bajos consumos de energía [13, 14, 15].

Otro de los desafíos en el desarrollo de sistemas de producción de biomasa microalgal enfocada en la fabricación de biodiesel, es la implementación de procesos de cosecha (centrifugación, floculación, filtración, flotación y sedimentación) y secado que sean económicamente viables a gran escala, debido a que estos dos procesos representan más del 50 % del costo de proceso global del cultivo [16, 17, 18].

El presente trabajo tuvo como objetivo el diseño de un fotobiorreactor tronco-cónico como método de cultivo y de recuperación de biomasa microalgal acoplado a una era de secado, la cual nos permitió la deshidratación de la biomasa obtenida sin tener que utilizar la centrifugación, un proceso energéticamente costoso.

1.8.-Objetivos

1.8.1.-Objetivo general.

Desarrollar un proceso de cultivo para la producción de lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. en un fotobiorreactor tronco-cónico y una era de secado para la recolección de biomasa.

1.8.2.-Objetivos particulares.

1. Diseñar y construir un fotobiorreactor de 1.5 L para el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp.
2. Diseñar y acoplar un fotobiorreactor tronco-cónico y una era de secado para la recolección de biomasa.
3. Determinar el perfil lipídico de la microalga *Scenedesmus* sp. cultivada en el fotobiorreactor y compararlo con el producido a nivel matraz.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1. Las microalgas como una fuente para la producción de biodiesel

El término microalga engloba a las algas microscópicas y a las bacterias fotosintéticas oxigénicas denominadas cianobacterias. Éstas presentan diferentes tipos de organización celular: unicelular, coloniales y filamentosas [19].

Se estima que existen cerca de 200,000 especies de las que sólo se han estudiado 35, 000. Su gran variabilidad las convierte en una fuente de productos de gran importancia económica como son los carotenoides, antioxidantes, ácidos grasos, polímeros, péptidos, esteroles, enzimas, entre otros compuestos de valor (Tabla 1.1) [20, 21, 22].

Tabla 1.1.- Microalgas más abundantes y sus productos de almacenamiento *[23]*

Algas	Especies conocidas	Material almacenado	Hábitats
Diatomeas (Bacillariophyceae)	100,000	Crisolaminarina (pólimeros de carbohidratos) y TAGs[1]	Océanos, agua dulce y salobres
Algas Verdes (Chlorophyceae)	8,000	Almidón y TAGs	Agua dulce
Algas Verde-azul (Cyanophyceae)	2,000	Almidón y TAGs	Diferentes hábitats
Algas Doradas (Chrysophyceae)	1,000	TAGs y carbohidratos	Agua dulce

[1] TAG's = Triacilglicéridos

Entre las especies más cultivadas se encuentran: *Chlorella, Dunaliella, Isochrysis, Nannochloris, Nannochloropsis, Neochloris, Nitzschia, Phaeodactylum* y *Porphyridium spp*, que poseen niveles de aceites en intervalos de 1-85 % con respecto a su peso seco (Tabla 1.2) [24, 25].

Tabla 1.2.- Contenido de lípidos y productividad de las microalgas

	Especie de microalga	**Contenido lipídico (% peso seco de biomasa)**	**Productividad lipídica (mg ·L^{-1}·d^{-1})**
Agua dulce	*Botryococcus* sp.	25.0-75.0	-
	Chaetoceros muelleri	33.6	21.8
	Chlorella calcitrans	14.6-16.4/39.8	17.6
	Chlorella emersonii	25.0-63.0	10.3-50.0
	Chlorella protothecoides	14.6-57.8	1214
	Chlorella sorokiniana	19.0-22.0	44.7
	Chlorella vulgaris	5.0-58.0	11.2-40.0
	Chlorella sp.	10.0-48.0	42.1
	Chlorella pyrenoidosa	2.0	-
	Chlorella sp.	18.0-57.0	18.7
	Chlorococcum sp.	19.3	53.7
	Ellipsoidion sp.	27.4	47.3
	Haematococcus pluvialis	25.0	-
	Scenedesmus obliquus	11.0-55.0	-
	Scenedesmus quadricuada	1.9-18.4	35.1
	Scenedesmus sp.	19.6-21.1	40.8-53.9
Marinas	*Dunaliella* salina	6.0-25.0	116.0
	Dunaliella primolecta	23.1	-
	Dunaliella tertiolecta	16.7-71.0	-
	Dunaliella sp.	17.5-67.0	35.1
	Isochrysis galbana	7.0-40.0	-
	Isochrysis sp.	7.1-33	37.8
	Nannochloris sp.	20.0-56.0	60.9-76.5
	Nannochloropsis oculata	22.7-29.7	84.0-142.0
	Nannochloropsis sp.	12.0-53.0	60.9-76.5
	Neochloris oleabundans	29.0-65.0	90.0-134.0
	Pavlona salina	30.9	49.4
	Pavlona Lutheri	35.5	40.2
	Phaeodactylum tricornutum	18.0-57.0	44.8
	Spirulina platensis	4.0-16.6	-

Las microalgas poseen un 10% más de eficiencia en la conversión de la luz (en comparación con las plantas superiores) para la síntesis de almidón, aceites y azúcares que pueden ser utilizados para la producción de biocombustibles; en comparación con 1-2% que se puede obtener del maíz para la producción de bioetanol. Por otra parte, presentan una mejor asimilación del CO_2, agua y otros nutrientes, por lo que son capaces de producir 30 veces más aceite por unidad de área en comparación con las semillas oleaginosas [23, 26].

En la tabla 1.3 se presentan algunas ventajas y desventajas que posee la biomasa de las microalgas en la producción de biodiesel [26].

Tabla 1.3.- Ventajas, desventajas y desafíos de la biomasa de microalgas

Ventajas:	**Desventajas:**
– Gran variedad en la naturaleza y cepas modificadas genéticamente – Sostenibilidad y tecnología de carbono neutral (secuestro de CO_2) – Utilización de CO_2 como fuente de energía – Son capaces de producir su propia energía – Contribuyen a la seguridad energética – Evitan el uso de combustibles fósiles escasos – Tasa de reproducción alta – Alto rendimiento por hectárea – Alto contenido de aceite – No hay competencia por el uso del suelo agrícola (paramos y desiertos) – No hay competencia por agua dulce – Alto crecimiento en aguas salobres y marinas – Biocombustibles altamente biodegradables, no contiene azufre, no contamina al medio ambiente	– Los métodos de procesamiento de biomasa se encuentran aún en desarrollo – Contaminación microbiana – Disponibilidad comercial limitada – Alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA[D≥4])
Desafíos: – Escalamiento de los métodos de producción – Utilización del CO_2 emitido por las industrias como fuente de carbono – Mejoramiento de los métodos de extracción	

Dentro de las fuentes elegibles para la generación de energía renovable, las microalgas destacan por su versatilidad, ya que a partir de su cultivo se puede obtener biodiesel, bioetanol, biometano, bioaceite y biohidrógeno. Aunque también destacan por su capacidad para la biorremediación de aguas residuales [27]. Desde los años 70´s las microalgas, como fuente alternativa de energía, son consideradas por las grandes ventajas que presentan en comparación con los cultivos oleaginosos. Es por esto que su cultivo está siendo impulsado por países como EUA, Nueva Zelanda, países del continente Europeo (España, Reino

Unido, Escocia) y ciertas regiones del Mediterráneo (Israel). Sin embargo, los sistemas de cultivo empleados para su desarrollo, así como los métodos de cosecha (que incluyen concentración de biomasa y deshidratación), extracción de aceite y transesterificación representan más de la mitad del costo global del proceso por lo que el concepto de biorrefinerías es un criterio a considerar al momento de realizar una producción de biocombustibles a gran escala [28].

1.2.-*Scenedesmus* sp.

La microalga *Scenedesmus* ha sido ampliamente estudiada para su posible aplicación como materia prima en la producción de biodiesel (Figura 1.1), esto debido a su perfil lipídico, en el que se puede observar como principales componentes el ácido palmítico (24-47%), ácido oleico (43-52%) y el ácido linoleico (7-11%), siendo éstos los que le brindan las propiedades físico-químicas adecuadas para ser empleados en la fabricación de biodiesel [29, 30, 31]. Algunas técnicas empleadas para la extracción de lípidos en esta especie son la extracción por solventes, la extracción por Soxhlet, el ultrasónico y la extracción por sistemas de microondas, con respecto a este último puede destacarse el hecho de ser un proceso con un tiempo mínimo de extracción de 30 min y con temperaturas en intervalos de 80-95 °C, presentando rendimientos entre un 76-77 %, que no supera la eficiencia del 98 % de extracción por solventes [32].

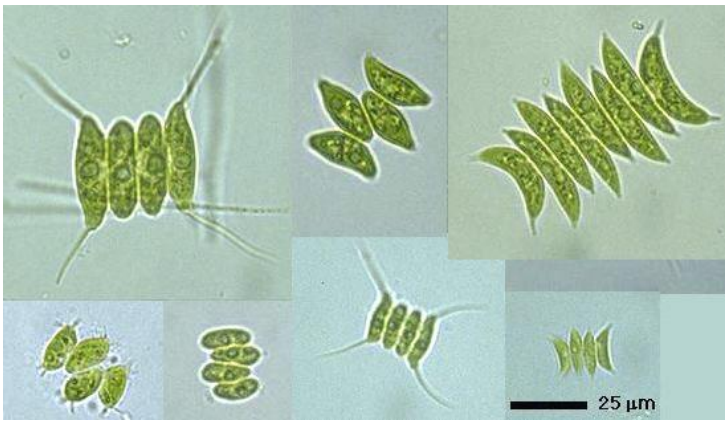


Figura1.1. Microalga *Scenedesmus* sp.

Los cultivos a escala laboratorio se han realizado en reactores agitados tipo tanque, en columnas de burbujeo o de tipo airlift y de placa plana. A nivel industrial la cosecha de esta especie es complicada por lo que algunos de los equipos empleados en esta tarea son la centrífuga de inyección, la cual brinda un 15% de concentración de SST (sólidos suspendidos totales), el separador de Lamella y los tanques de sedimentación que con la adición de un floculante proporcionan una concentración de 1.5 % de SST [17].

Scenedesmus es una especie de fácil cultivo, empleada no sólo en estudios para la producción de biodiesel, sino también para la mitigación de CO_2 y la biorremediación de aguas residuales [33, 34, 35, 36]. Las características que presenta el género *Scenedesmus* son la presencia de tallos unicelulares o colonias formadas de 2 a 32 células, usualmente cenobios de 4 a 8 células. Se encuentran rodeadas de una matriz mucilaginosa que puede estar presente o ausente en las células. Son casi esféricas, elipsoidales alargadas o fusiformes, su pared celular interna posee una capa de hemicelulosa y la pared externa, una capa de esporopolenina. El tipo de reproducción que se puede observar en dicho género es asexual por autoesporas; sin embargo, el subgénero *Acutodesmus* muestra raramente reproducción sexual. Este grupo vive principalmente en estanques de agua dulce, lagos eutróficos, raramente en aguas salobres y tolera rangos de temperaturas de 28 a 30°C. No obstante, puede observarse que algunas especies como *Scenedesmus almeriensis* soportan temperaturas de 36 °C o mayores [37] .

1.3.-Sistemas de cultivo

Una vez seleccionada la cepa de la microalga, es necesario el desarrollo de sistemas que faciliten su cultivo. Por lo tanto, el diseño y optimización de los fotobiorreactores para el crecimiento de estos microorganismos es crucial [38]. Estos deben de presentar características tales como: una productividad volumétrica alta, costos mínimos de inversión y mantenimiento, fácil control de los diferentes parámetros de cultivo (agitación, temperatura, pH, etc.), así como una alta confiabilidad tecnológica [39]. Los sistemas para el crecimiento de microalgas son de dos tipos: abiertos y cerrados.

1.3.1.-Sistemas abiertos

Los sistemas abiertos son los más utilizados a nivel comercial (Figura 1.2).

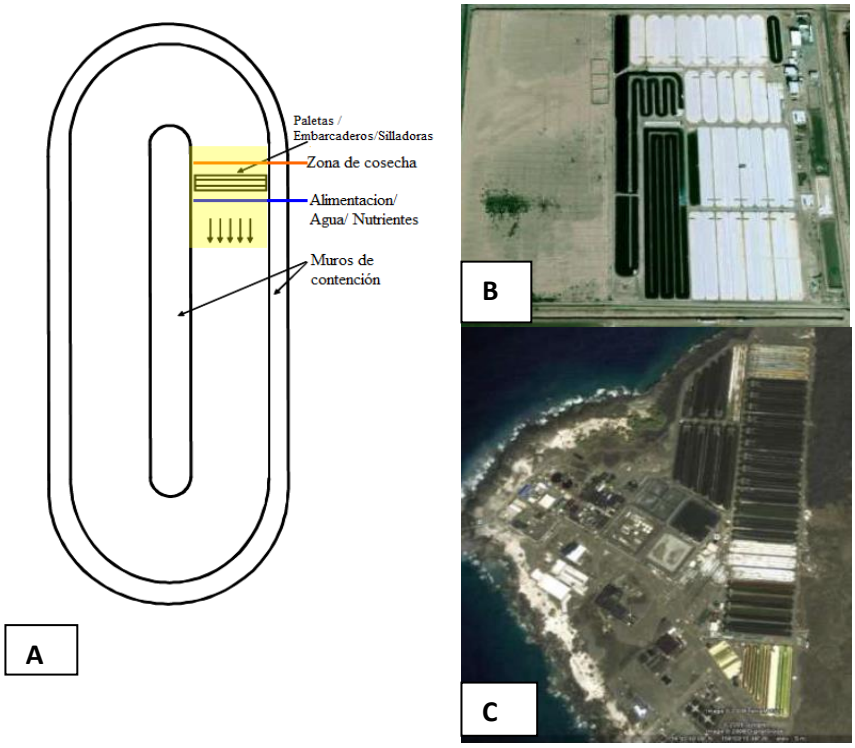


Figura 1.2.-Sistemas abiertos: A) Diseño tipo circuito; B) Producción intensiva de *Spirulina* (Earthrise Nutraceuticals LLC, California); C) Producción intensiva de *Spirulina* y *Haematococcus pluvialis* (Cyanotech Corp. Hawaii) [40].

Según Borowitzka existen cuatro tipos: grandes estanques abiertos, estanques circulares con componentes giratorios, tipo circuito y de tipo bolsas [41].

De manera general, los sistemas abiertos, presentan ventajas, tales como facilidad de construcción y operación, en comparación con los sistemas cerrados, son capaces de utilizar la luz solar, algunos nutrientes o sales de la tierra y aguas residuales de las plantas de tratamiento [38]. Sin embargo, éstos presentan una serie de inconvenientes, como lo son el limitado número de especies de microalgas cultivables y la evaporación. Siendo este último factor el que dificulta la preservación del contenido hídrico en los equipos, así como la pérdida del CO_2 (sólo el 13-20 % es absorbido en los cultivos). Además se requiere de

grandes extensiones de tierra (0.2 a 0.5 ha) y la productividad es menor en comparación con los sistemas cerrados (0.117 kg m^{-3} d^{-1}) [41, 42, 43, 44, 45, 40]. Debido a estos inconvenientes se han desarrollado sistemas cerrados competitivos para el cultivo de las microalgas.

1.3.2.-Sistemas cerrados

1.3.2.1.-Fotobiorreactores

Los fotobiorreactores se emplean principalmente para cultivos unialgales [14]. Se caracterizan por regular y controlar, casi por completo, los parámetros biotecnológicos inmersos en el proceso (pH, iluminación, agitación), manteniendo bajos riesgos de contaminación, no presentan pérdidas de CO_2, tienen una hidrodinámica y temperatura controlable [21]. De igual manera, presentan una alta productividad con respecto al volumen del reactor (por ejemplo, un fotobiorreactor tubular de 700 m^3 y una superficie de 10,000 m^2 presentan una productividad anual similar de 130 a 150 toneladas de biomasa seca). También son eficientes en el contenido hídrico en los sistemas, es decir, reducen la evaporación del medio. Todo esto, convierte a los fotobiorreactores en sistemas adecuados para el cultivo de las microalgas [46]. Las desventajas como la condensación de agua o contaminación biológica [47], la penetración reducida de la luz debido al tipo de material a emplear en su construcción, representan algunos de los inconvenientes de estos equipos, por lo que es importante una alta relación de volumen-superficie, lo que permitiría una mejor eficiencia fotosintética de la especie, la cual se vería reflejada en una alta productividad (1.535 kg m^{-3} d^{-1}) [48, 14].
Estos sistemas se pueden clasificar en tres principales categorías: tubulares (horizontal/vertical, serpentín o helicoidal [49]), de placa plana y los de columna [50].

a) Tubulares

Es uno de los modelos de fotobiorrectores más adecuados para el cultivo de las microalgas a gran escala, ya que poseen una gran área superficial para la iluminación [49, 51]. Estructuralmente consiste en una matriz cerrada, en espiral o en bucle, de tubos

transparentes, cuyos materiales principalmente son plástico o vidrio (Figura 1.3) [52, 53]. En estos dispositivos, las microalgas circulan a través de tubos por medio de bombas que permiten un intercambio másico entre el medio líquido y el gas de la aireación, por ejemplo, se ha encontrado que aire enriquecido con 5-10 % de CO_2, a una velocidad de 0.025-0.05 vvm puede minimizar el daño celular [54].

Figura 1.2.-Fotobiorreactor tubular.

Las desventajas que presentan son crecimiento microalgal en las paredes del reactor, una pobre transferencia de masa a lo largo de los tubos, así como un mínimo control en la relación del pH, el cual conduce frecuentemente a una recarbonatación de los medios de cultivo que en consecuencia aumenta los costos de producción [38]. Los reactores tubulares se clasifican en:

i) De serpentín: Son sistemas de tubos transparentes rectos conectados en una serie de dobleces en forma de U para finalmente formar un bucle plano, el cual puede estar dispuesto en forma vertical u horizontal [55]. No poseen un sistema de control de temperatura, lo que representa un problema para regular la operación [56, 57]. A principios de 1950, la empresa Arthur D. Little, en el Instituto de Tecnología de Massachusetts, diseñó un sistema horizontal tubular para el cultivo de *Chlorella.* Ahora es considerada como la primera planta piloto para la producción de microalgas [55].

ii) Helicoidales: Consisten en una serie de tubos de polietileno transparentes soportados en un marco circular. Pueden estar equipados con un intercambiador de gases e intercambiador

de calor. En general, presentan una alta eficiencia área-volumen por lo que no necesitan de grandes áreas para su implementación. El escalamiento de estos dispositivos se lleva a cabo relativamente fácil y el medio es impulsado por una bomba centrifuga a lo largo de la torre. Sin embargo, este tipo de bomba empleada para el mezclado conlleva a un aumento en el efecto de cizallamiento [41].

b) De placa plana

Estos equipos presentan importantes ventajas para la producción en masa de microorganismos fotoautotrofos, debido a que poseen una gran área superficial de iluminación (Figura 1.4), convirtiéndolos en un tipo de reactor estándar para la producción de varias especies de microalgas [49]. La construcción de este tipo de biorreactores comenzó desde la década de los 50´s [55].

Figura 1.3.-Fotobiorreactor de placa plana.

Generalmente los fotobiorreactores de placa plana están hechos de materiales transparentes para maximizar el aprovechamiento de la energía solar. La mayor ventaja de estos sistemas es la unidad de transferencia de gas, la cual ha demostrado ser eficaz en la reducción de la acumulación de oxígeno en el medio. Sin embargo, esta zona abierta de transferencia de gas restringe el control de la contaminación en comparación con los tubulares o de columna de

burbujeo [58, 59, 60]. La iluminación de los paneles es, principalmente, por un lado de manera directa al sol. Puede ser posicionado verticalmente o inclinado para optimizar la captación de la radiación solar [48, 61]. Entre las limitantes que presentan estos sistemas están la dificultad de controlar la temperatura del cultivo, cierto grado de crecimiento en las paredes del equipo, la posibilidad de estrés hidrodinámico para algunas cepas de microalgas y dificultades con respecto al tipo de material a la hora de realizar el escalamiento [24]. A escala piloto se presentan tres tipos: los paneles alveolares, placas de acrílico y vidrio, y los paneles desechables.

c) De columna

Son denominados también como tanques de agitación, columnas de burbujeo o Airlift (Figura 1.5). Estructuralmente son columnas verticales aireadas por la parte baja del dispositivo, el cual es iluminado a través de sus paredes transparentes o por la parte interna del equipo [62, 63, 64]. Son compactos y fáciles de operar monosépticamente, además de ser equipos prometedores para el cultivo de las microalgas a gran escala [65].

En este tipo de reactores, los Airlift se han utilizado para realizar estudios de crecimiento y productividad de *Chlorella* y *Nannochloropsis* [61]. Contreras *et al.* mostraron que la productividad volumétrica media anual en una columna de burbujeo con un diámetro de 0.1 m es de aproximadamente 1 $kg \cdot m^{-3}$ d^{-1} de cultivo de *Tricornutum phaedactylum* [53, 66]. Por su parte, Sánchez *et al.* reportaron que con la misma especie de microalga pero con un fotobiorreactor de 0.2 m de diámetro y 2.1 m de altura, obtuvieron una productividad media anual de 0.49 $kg \cdot m^{-3}$ d^{-1} [53]. Los fotobiorreactores de columna sólo pueden extenderse unos pocos metros de altura (4 m máx.) debido a que esto aumenta los costos del equipo y disminuye su productividad.

Los reactores de columna presentan una variante, los denominados fotobiorreactores tronco-cónicos, en ellos se ha cultivado *Dunaliella salina* en condiciones externas. Entre las ventajas que presentan estos sistemas podemos mencionar su alta transferencia de masa,

bajos consumos de energía, mezclado con bajo estrés de cizallamiento, reducción de la fotoinhibición y fotooxidación [14, 67, 68].

Estos tipos de sistemas de cultivo cerrados son recomendables, debido a su facilidad de escalamiento, una mejor hidrodinámica y bajos consumos de energía.

Figura 1.4.-Fotobiorreactor de Columna.

1.4.-Parámetros de crecimiento de las microalgas en fotobiorreactores

En la producción de biodiesel a partir de las microalgas, es importante considerar la composición del medio y los factores de crecimiento. Existen 4 principales tipos de condiciones para el cultivo de las microalgas: fotoautotróficas, heterotróficas, mixotróficas y fotoheterotróficas [69] (tabla 1.4).

Tabla 1. 4.- Tipos de metabolismo en las microalgas en función a su tipo de cultivo

Condición de cultivo	**Recurso de energía**	**Recurso de carbono**	**Ejemplo**
Fotoautotrófico	Luz	Inorgánico	Cianobacterias
Heterotrófico	Orgánico	Orgánico	*E. Coli*
Mixotrófico	Luz y orgánico	Inorgánico y orgánico	*Chlorella*
Fotoheterotrófico	Luz	Orgánico	Moradas y verdes bacterias fotosintéticas

Los parámetros más importantes para el crecimiento de las microalgas son:

1) Energía lumínica. Es uno de los parámetros más importantes en el diseño y construcción de los fotobiorreactores [70] debido a que una exposición prolongada de luz puede tener graves consecuencias para el cultivo: la tasa fotosintética (con un teórico máximo de 29 % calculado como 8 moles de cuantos de luz por 1 mol de CO_2 fijado) disminuye debido al daño ocasionado en el PS II (fotosistema P680) dando lugar a la fotoinhibición. En consecuencia ocurre una disminución del contenido de clorofila a y otros pigmentos, así como la activación de agentes fotoprotectores [19], tales como carotenoides secundarios (zeaxantina, β-caroteno, astaxantina).

En los fotobiorreactores, la luz es suministrada continuamente o en fotoperiodos (ciclos de luz/oscuridad). Es necesario tomar en cuenta que la concentración celular es un factor cambiante y por lo tanto, la intensidad de la luz (en $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ o $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) se verá afectada por la densidad celular; por lo que muchos autores recomiendan mantener una trayectoria de la luz (distancia transversal que debe recorrer un fotón para atravesar las paredes del reactor) no mayor a los 10 cm [70].

2) CO_2. El CO_2 como fuente de carbono inorgánico para los cultivos de microalgas es suministrado en el medio a una concentración de 1 a 5 % (v/v). A menudo esta producción conduce a un crecimiento máximo. Sin embargo, diversas especies son capaces de tolerar concentraciones mayores al 80 % de CO_2. En los fotobiorreactores, el CO_2 es suministrado por medio de la aireación por lo que es importante mantener un flujo continuo de CO_2 para evitar cambios en el pH y un aumento acelerado del oxígeno ya que puede ocasionar la inhibición del cultivo [14, 21, 71].

El CO_2 es uno de los gases de efecto invernadero que causa gran preocupación en la actualidad [72], por lo que muchos autores proponen la utilización de este gas liberado por las industrias como fuente de carbono. Esto representa una de las ventajas que las microalgas poseen en comparación con los cultivos energéticos (Tabla 1.5), por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas cepas capaces de tolerar concentraciones de hasta un 100 % de CO_2 [73].

Tabla 1.5.- Microalgas tolerantes al dióxido de carbono.

Microalga	Máxima concentración de CO_2
Cyanidium caldarium	100 %
Scenedesmus sp.	80 %
Chlorococcum litorale	60 %
Synechococcus elongatus	60 %
Euglena gracilis	45 %
Chlorella sp.	40 %
Eudorina sp.	20 %
Duneliella tertolecta	15 %
Nannochloris sp.	15 %
Chlamydomonas sp.	15%
Tetraselmis sp.	14 %

3) Macro y micronutrientes. La disponibilidad de los nutrientes es un factor que controla los niveles primarios de producción en los organismos fotosintéticos [74, 75]. El medio de cultivo en general contiene elementos considerados como macro y micronutrientes. Entre los macronutrientes se encuentran el Carbono (orgánico e inorgánico), Nitrógeno, Fósforo, Hidrógeno, Oxígeno, Azufre, Calcio, Magnesio, Potasio, Sodio y Cloro. Con respecto a los macronutrientes, el Nitrógeno, después del Carbono, contribuye a la producción de biomasa, representando 7- 10 % en porcentaje de peso seco. El Nitrógeno, suministrado en forma compuesta como Nitratos, Amoniaco o Urea, es un constituyente esencial en todas las proteínas estructurales y funcionales. Condiciones limitadas de Nitrógeno ocasionan que el CO_2 que se fija en la fotosíntesis para la síntesis de proteínas se dirija a la síntesis de lípidos o hidratos de carbono. Diversos estudios demuestran que la biosíntesis y la acumulación de los lípidos incrementan bajo condiciones limitadas de este nutriente [19]. Los micronutrientes son el Hierro, Boro, Manganeso, Cobre, Molibdeno, Vanadio, Cobalto, Níquel, Silicio y Selenio [76]. Muchos de estos elementos trazas son importantes en las reacciones enzimáticas y en la biosíntesis de compuestos, por ejemplo, el Co es esencial para la producción de vitamina B12 [19].

4) Temperatura y pH. Son parámetros de gran importancia después de la luz y el CO_2 [70]. La temperatura influye directamente en la eficiencia fotosintética, específicamente en la actividad de la enzima Rubisco, que es la encargada de fijar el CO_2. El intervalo de temperatura para el cultivo de microalgas es muy amplio debido a que depende de la especie. Generalmente se encuentra entre 20-24 °C; una temperatura superior a los 35 °C puede ser letal debido a que la relación O_2:CO_2 en solución aumenta haciendo que la enzima Rubisco fije O_2 en lugar de CO_2 provocando la fotorrespiración [21, 70, 71, 77, 78, 79].

Por otra parte, el pH está relacionado con la concentración del CO_2, es decir, a medida que el dióxido de carbono es consumido, el pH se eleva causando un desequilibrio químico con respecto al medio y la asimilación de nutrientes en las células. El intervalo de pH óptimo de crecimiento para las microalgas se encuentra entre 7-8.5 [21, 70, 71, 80].

5) Agitación y transferencia gaseosa. Estos parámetros favorecen el intercambio gaseoso en el medio, no permiten la sedimentación de las células, concediéndoles de esta manera el paso de la luz al interior del cultivo. También disminuyen los gradientes de concentración de nutrientes, permitiendo que éstos se dispersen homogéneamente en el medio. Debido a esto, los parámetros mencionados inciden en el crecimiento celular y en el almacenamiento de metabolitos de interés, de allí la importancia de su constante monitoreo.

En los fotobiorreactores de columna de burbujeo o tipo airlift, la agitación puede conseguirse a través de dispositivos que reducen el efecto de cizallamiento que podrían presentar las células. La tasa de aireación se encuentra en un intervalo de 0.6 a 4.21 vvm [70, 71, 81].

1.5.-Produccion de biomasa microalgal

La producción de biodiesel (Figura 1.6) a partir de biomasa microalgal requiere de técnicas específicas para el cultivo, recolección, secado, extracción y conversión que sean económicamente viables a nivel industrial [82].

Los métodos de cosecha y secado presentan un alto impacto en el costo global de producción, por lo que es necesaria la selección adecuada de las técnicas a aplicar en estas etapas tomando en consideración las características de la especie a cultivar.

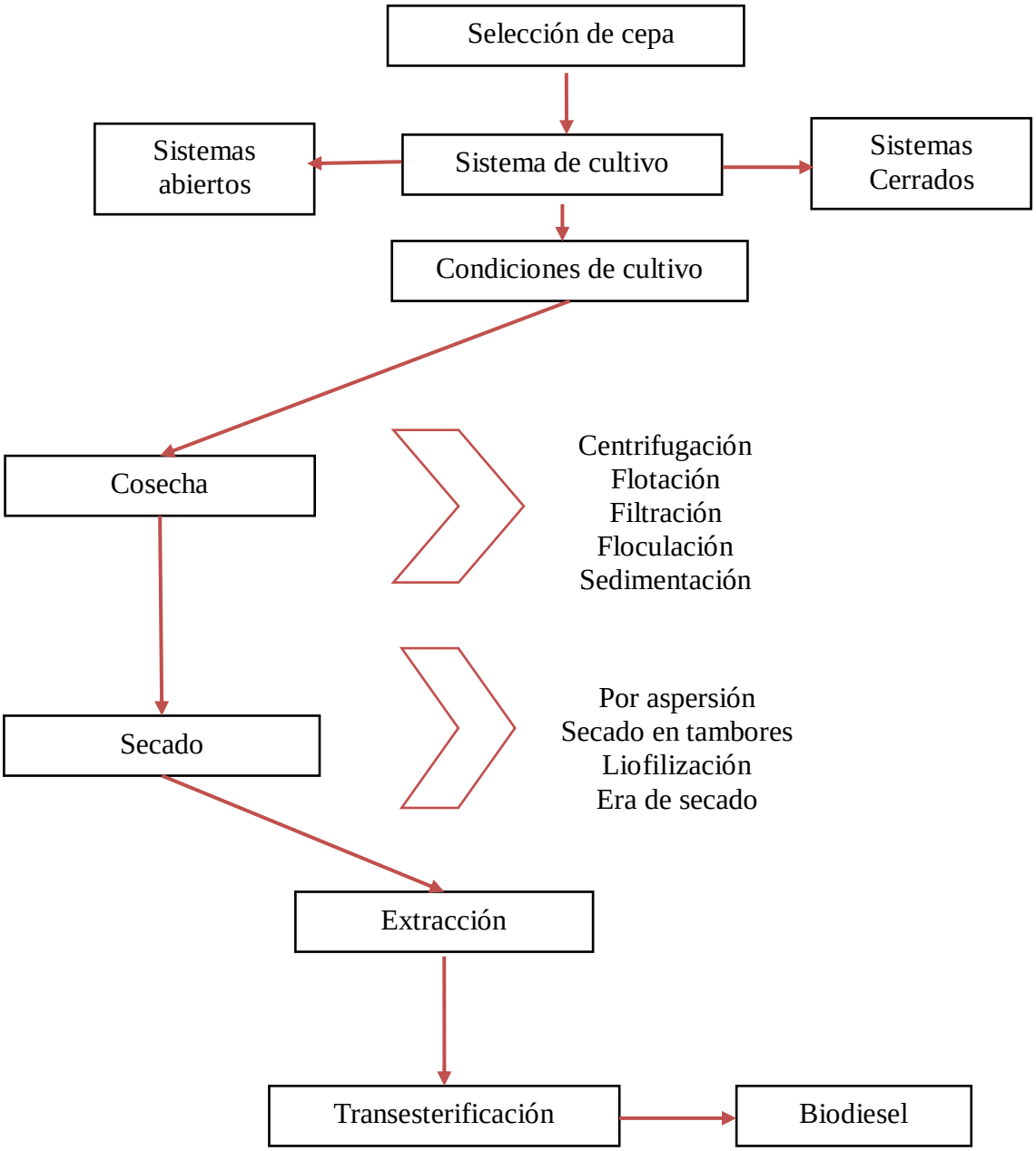


Figura 1.6.-Esquema de producción de biodiesel.

1.5.1.- Métodos de cosecha

La recolección o cosecha de biomasa microalgal es la tercera etapa de la producción de biodiesel y uno de los pasos más desafiantes de todo el proceso de producción de este biocombustible debido al tamaño microscópico de las células microalgales, además de que esta etapa representa del 20-30 % del costo total de producción. El método empleado para la recolección depende de la densidad de la suspensión de la biomasa y de las características de la cepa seleccionada [24, 83, 84, 85]. (En el Anexo I, se presentan tablas comparativas de los diferentes métodos que aquí se exponen).
Generalmente el proceso de recolección de biomasa se divide en dos etapas, tomando en cuenta las características que presenta la especie a cosechar [39].

La ***cosecha a granel***, consiste en separar directamente la biomasa del medio de cultivo. Para ello se incluyen técnicas como:

a) **Floculación.** Se emplea para aglomerar las células microalgales en el medio de cultivo. Puede ser utilizada como una etapa primaria de concentración de biomasa. Las cargas superficiales que presentan las microalgas (cargas negativas que le impiden su agregación en la suspensión) pueden ser contrarrestadas con la adición de floculantes sin afectar la composición o adicionar toxicidad al producto [86]. La floculación es un proceso sencillo y presenta una amplia clasificación en la que se incluyen la ***autofloculación***, la cual se produce por la presencia de iones de Magnesio y Calcio en el medio, a un pH alto, provocando la agregación de células microalgales [87]; la ***biofloculación,*** en la cual se utilizan polímeros biodegradables como el quitosano y el alginato de sodio o microbial como Pestan para aglomerar células y hacer más fácil su cosecha [87]; la ***electrofoculación,*** la cual es un proceso complejo en el que intervienen especies químicas como iones metálicos sometidos a fenómenos eléctricos que permiten la formación de flóculos [88]; la ***floculación orgánica,*** la cual ocurre por la adición de una sustancia de alto peso molecular que permite un mayor aumento del tamaño del flóculo, mejorando la sedimentación del cultivo. Presenta como ventaja el hecho de ser necesario en pequeñas cantidades, siendo más eficientes los floculantes

catiónicos [89] y la ***floculación inorgánica,*** en la que se utilizan compuestos como cloruro de hierro, sulfato de aluminio y sulfato férrico. La desventaja de estos floculantes es que contaminan la biomasa [90, 61, 17]. La eficiencia de los floculantes se ve afectada por el pH del medio, la concentración de la biomasa, los tipos de polímeros utilizados, la densidad de cargas de las moléculas, la fuerza inicial y el grado de mezcla de los fluidos [83]. En el Anexo 1 se presentan los floculantes utilizados en la cosecha de microalgas.

b) **Flotación.** Es el proceso por medio del cual se capturan las células microalgales utilizando dispersores de microburbujas de aire. A diferencia de la floculación, no necesita de la adición de químicos [91]. Este método, respecto a la sedimentación, es más rápido ya que sólo requiere un par de minutos en lugar de horas para la sedimentación [92]. Existen tres variaciones de este método: ***flotación por aire disuelto***, el cual presenta una reducción de presión en la corriente principal, la cual se pre-satura de aire formando burbujas que arrastran a la superficie las partículas para así facilitar su cosecha. Los factores que intervienen en la cosecha son el tiempo de retención hidráulico, la presión del tanque y la flotación del tipo de partícula [85]; ***flotación por aire disperso***, en la cual se generan burbujas por agitación combinada con una entrada de inyección de aire. Para este método, la separación de las microalgas está en función del tipo de colector, pH, temperatura y tasa de aireación [85]; ***electroflotación,*** en la que las burbujas de hidrógeno formadas por la electrólisis se adhieren a las partículas y son llevadas a la superficie donde son separadas por espumadoras [85]. En el Anexo 1 se presentan las comparaciones entre estos métodos.

c) **Sedimentación por gravedad.** Método adecuado para microalgas grandes (> 70 µm) [93]. Representa una de las técnicas más comunes para la recolección de biomasa microalgal en el tratamiento de aguas residuales. Los factores que intervienen en la eficiencia de esta técnica son la densidad y el radio de las células microalgales [67]. Si éstas poseen propiedades de sedimentación inferiores, es necesario la aplicación de agentes floculantes para mejorarla [92]. A pesar de la simplicidad del método, es un proceso bastante lento y puede producir deterioro de la biomasa durante la separación.

Las ventajas que presenta este método son costos de inversión baja, control de proceso y susceptibilidad de aplicación a escala mayor. En el Anexo 1 se presenta la tabla comparativa de los tipos de sedimentación.

El **Espesamiento** tiene como objetivo primario la concentración de la suspensión, este incluye métodos como:

a) **Centrifugación.** Es un proceso de sedimentación acelerada que opera mediante la rotación de las paredes de un contenedor o por medio de sistemas de paredes fijas denominadas hidrociclones [92]. La recuperación de biomasa por este medio depende de las características que presentan las células para su sedimentación, el tiempo de residencia de éstas dentro de la centrífuga y la profundidad de sedimentación en el equipo [83]. Este método es el preferido al momento de colectar microalgas debido a que no se requiere la adición de ningún floculante. Sin embargo, se necesita de un mayor suministro de energía eléctrica por lo que es demasiado caro a gran escala. La recolección de biomasa por este medio presenta una eficiencia >95 % [94].
b) **Filtración.** Este proceso es el ideal cuando se trata de microalgas relativamente grandes (> 70 µm). Sin embargo, para especies de dimensiones bacterianas (< 30 µm) no es adecuada [17], por lo que se recomienda utilizar la microfiltración y membranas de ultra-filtración como dispositivos de recolección [95]. Los tipos de filtración se clasifican dependiendo de la caída de presión, éstos pueden ser por gravedad, vacío, presión o filtración magnética. Su principal limitante es la obstrucción que presentan los filtros utilizados [96]. En el Anexo 1, se presenta una tabla comparativa de estos filtros.

El método de cosecha utilizado en la recolección de biomasa de microalgas es un punto importante al momento de establecer un proceso de cultivo, debido a que presenta un alto porcentaje de impacto en la cadena de producción.

1.5.2.-Métodos de secado

Para la producción del biodiesel, el secado representa una cuarta etapa del proceso global. Esta etapa es de suma importancia debido a que el contenido hídrico presente en la biomasa inhibe los procesos de extracción de lípidos y su transesterificación [27]. Es por esto que el secado de la materia prima es ventajoso para un almacenamiento estable. El secado constituye entre el 70-75 % del costo total del proceso. Es necesario tomar en cuenta que a pesar de que la mayoría de los métodos para secar lodos son también utilizados para el tratamiento de biomasa, no todos son adecuados para el procesamiento de los lodos microalgales [97]. Entre estos métodos se encuentran:

a) **Secado flash.** Emplea una corriente de gas caliente en el cual se inyecta la materia a secar [97].
b) **Tambores rotatorios.** Consiste en un cilindro giratorio, el cual pone en movimiento la materia que es secada de un extremo al otro del equipo por gravedad [96]. Se emplea en procesos de fermentación y en el secado de lodos de aguas residuales [98].
c) **Por aspersión.** Este proceso es el más adecuado para secar la biomasa proveniente de cultivos en estanques [98]. La biomasa se hace pasar por una columna, en el sentido de arriba a abajo, mientras una corriente de gas caliente pasa de manera inversa, secando la materia en segundos. El producto final se obtiene por la parte inferior del equipo y el flujo de vapor caliente sale a través de un separador ciclónico [96]. Este método es uno de los más adecuados para el secado de biomasa con un alto valor económico; sin embargo, es un proceso de alto gasto económico y poco rentable en el caso de la producción de biodiesel [83, 67].
d) **Secado en tambor.** La biomasa se hace pasar por una serie de tambores calientes. Este proceso permite el adelgazamiento de la muestra, presentando la forma de una película muy delgada, lo cual facilita su almacenamiento posterior [98].
e) **Liofilización y secador toroidal.** En el primer caso, la muestra se introduce en una cámara de vacío en la cual se realiza la separación del agua presente en la biomasa por medio de la sublimación [98]. Sin embargo, esta técnica es altamente costosa a

gran escala [83, 99]. El segundo equipo funciona bajo el principio de un molino de chorro, la materia a secar se mueve completamente a alta velocidad por medio del aire [97].

f) **Secado al sol.** Es uno de los métodos más antiguos conocidos por el hombre para conservar alimentos. Su principal objetivo es la reducción del contenido hídrico, lo cual permite el almacenamiento seguro de la materia por un tiempo prolongado. En las zonas donde otras formas de suministro de energía no están disponibles, por ejemplo, en áreas remotas sin acceso a una red de energía eléctrica [96], el secado al sol, como proceso de deshidratación de biomasa, es el medio más factible de secado, esto debido a que emplea energía solar como fuente alternativa preferida, ya que es abundante, inagotable, renovable, barata y no contaminante [100]. Este método de secado se realiza exponiendo la materia directamente al sol o de manera indirecta. En esta última, se hace pasar una corriente de agua caliente por medio de tubos que rodean el contenedor logrando de esta manera un menor tiempo de secado [96, 101]. Para el caso de los lodos de aguas residuales existe una variante de este método denominado ***Era de secado***, la cual consiste en la formación de una cama de arena y grava donde se extiende la materia a secar. Esta variante también puede ser aplicable a la biomasa algal [102]. El secado al sol se ha empleado en la deshidratación de productos agrícolas tales como el café, el tabaco, el té, granos de cacao, arroz, frutos secos, madera y en los últimos años se ha empleado como método de secado de la biomasa microalgal [103]. En Sde Boker, Israel, se emplea una mezcla de 20% de biomasa de *Spirulina* mezclada con harina de maíz, la cual es secada al sol. La deshidratación se completa cuando la materia presenta un contenido de humedad del 10%, el tiempo de exposición es de un solo día. Esta materia se utiliza exitosamente como dieta para la Tilapia [97]. La biomasa microalgal cosechada de la presa Hartbeespoort, por medio de la flotación, se vierte en camas de arenas colocadas sobre placas metálicas que sirven como soporte de la misma, se dejan secar durante 24 horas en una superficie de 0.0484 m^2 con 497.7 g de arena, obteniendo en promedio 7.6 g de biomasa seca, lo que anualmente representa un rendimiento de 4.6 kg L^{-1} a^{-1} de biomasa por litro de pasta obtenida de la presa y un promedio anual de rendimiento por área de cosecha de 47.3 kg m^{-2} a^{-1}

de biomasa deshidratada que se logra por metro cuadrado de área de secado. La arena mejora la separación del agua contenida en la biomasa, aumentando la zona de secado y por lo tanto un aumento en la velocidad de la misma, mientras que la radiación solar proporciona la energía para evaporar la humedad [104]. Entre las ventajas del método de secado al sol podemos destacar el menor costo de inversión en el equipo, la no dependencia de combustible fósil, el empleo de tierras marginales como áreas de secado y la utilización de la energía solar que es barata y no contaminante. Este método de secado es muy ventajoso no sólo por su viabilidad económica sino por el hecho de ser un proceso limpio y sustentable. Las principales desventajas de este método es su dependencia a la climatología de la región y el requerimiento de grandes extensiones [96, 98, 67]. Sin embargo el requerimiento de grandes extensiones puede ser una ventaja si se emplean extensiones de tierras marginales.

1.6.-Justificación

El cultivo a gran escala de las microalgas para la producción de biodiesel requiere de la implementación de sistemas de bajo costo y alta eficiencia. Los fotobiorreactores de columna de burbujeo con base tronco-cónica, se plantean como un método de cultivo atractivo y ventajoso para la recuperación de biomasa microalgal. Su acoplamiento a una era de secado permitirá la deshidratación de la biomasa obtenida.

1.7.-Hipótesis

El empleo de un fotobiorreactor tronco-cónico para el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp acoplado a una era de secado permitirá el cultivo y la recuperación de biomasa microalgal sin reducir el contenido lipídico de la especie obtenido a nivel matraz.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-Estrategia experimental.

Para lograr los objetivos del presente trabajo se empleó la siguiente estrategia experimental:

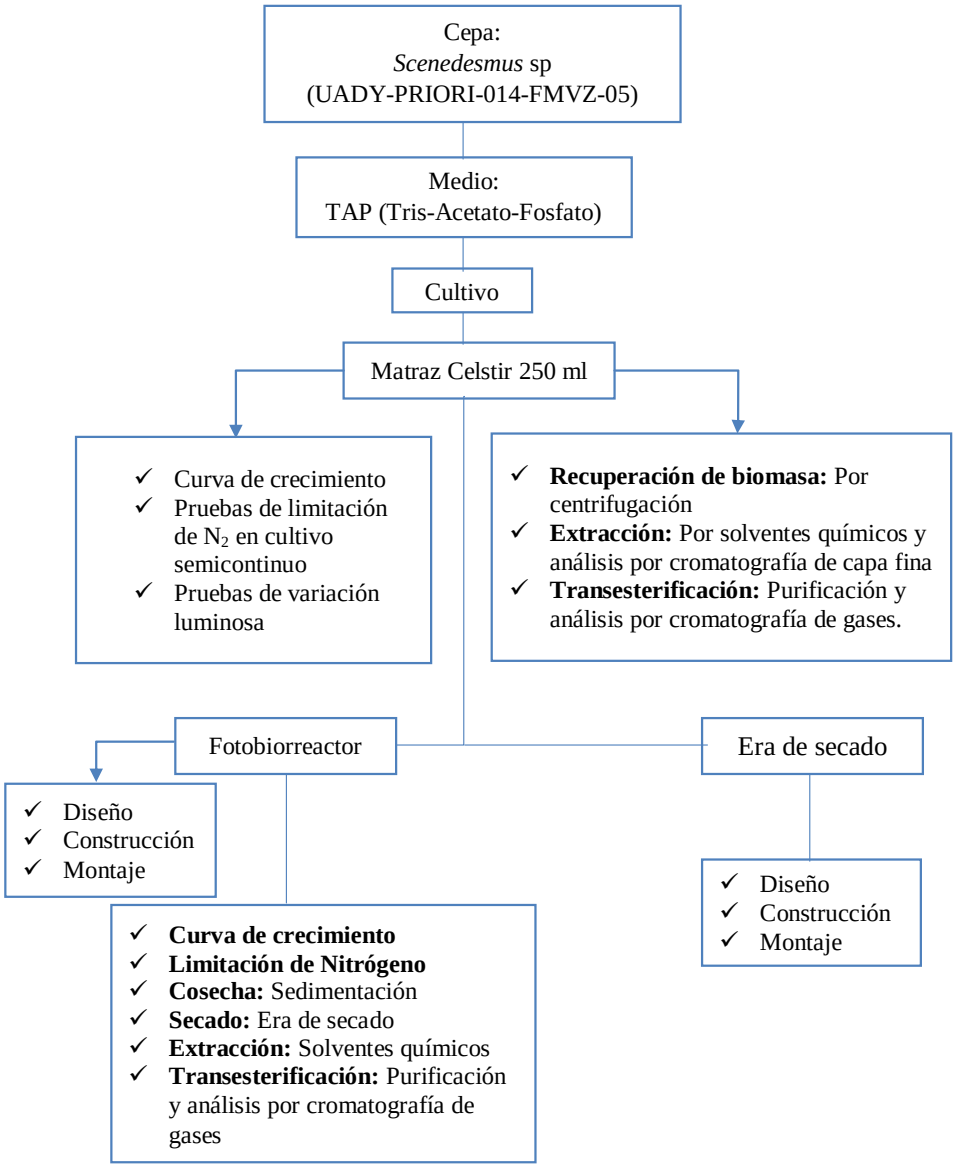


Figura 2.1.-Estrategia experimental para la producción de biomasa microalgal.

2.2.-Material biológico

La cepa *Scenedesmus* sp. (UADY-PRIORI-014-FMVZ-05) aislada en el parque Ecológico Brisas en Mérida Yucatán fue proporcionada por la Q.F.B. Silvia J. López Adrián, miembro del Departamento de Botánica del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la UADY.

2.3.-Medio de cultivo

El medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP, por sus siglas en Inglés) que se empleó en los pre-cultivos y cultivos (formulación del medio, Anexo II) se preparó con agua bidestilada, se ajustó el pH del medio a 7.0 con KOH 1M o HCl 1M y finalmente se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos y 1 atm de presión.

2.4.-Cultivo de la microalga

Para mantener el control de la densidad del inóculo en los cultivos se requirió de un pre-cultivo en estado líquido. Éste se llevó a cabo inoculando el medio TAP con una colonia de la microalga de estudio, proveniente de cultivos en cajas Petri con medio Bold´s Basal. Posteriormente, los cultivos experimentales en matraces Celstir de 250 mL se inocularon a una concentración de 10, 000 células$\cdot$mL^{-1} provenientes del pre-cultivo antes descrito. Las condiciones del pre-cultivo y cultivo fueron las siguientes: se incubaron por 5 días a una temperatura de 25 ± 2°C, con un fotoperiodo 16:8 horas (luz: oscuridad), a una intensidad lumínica de 30 µmol$\cdot$m$^{-2}\cdot$s^{-1}, en una agitadora "Wheaton Biostir 6 model III".

El fotobiorreactor tronco-cónico fue inoculado con un 10% v/v proveniente del cultivo en Celstir de 250 mL previamente descrito. Las condiciones del fotobiorrector fueron las siguientes: un flujo de aire de 1.6 vvm (Bomba Elite® 800) con un fotoperiodo 16:8 (luz: oscuridad) a una intensidad lumínica de 81 µmol$\cdot$m$^{-2}\cdot$s^{-1} y a una temperatura de 25 ± 2 °C.

2.5.-Conteo celular

Se determinó la concentración celular del cultivo tomando una muestra de 500 µL, se agitó en un Vortex, posteriormente se tomó una alícuota de 10 µL que fue depositada en un hematocitómetro Neubauer (Figura 2.2). Mediante un microscopio óptico "Nikon Eclipse E200" se observó a objetivo 40 X y se cuantificó el número de células.

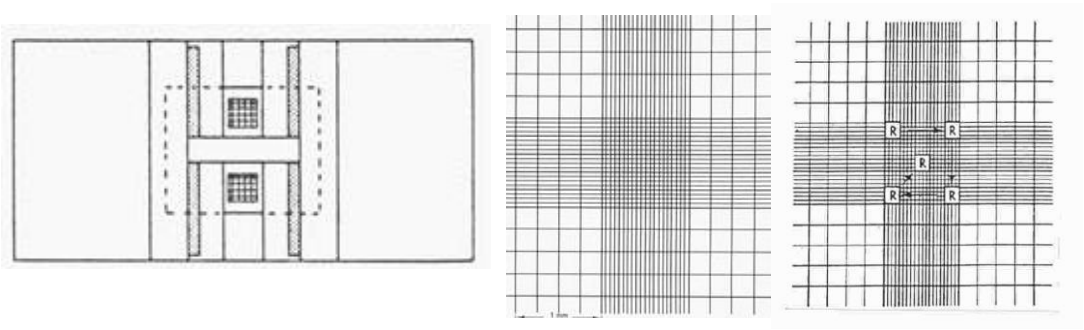


Figura 2.2.-Cámara de Neubauer [70].

Para el cálculo del número de células por unidad de volumen se dividió la cantidad de células halladas en las áreas señaladas entre el volumen correspondiente, de la siguiente manera:

$$\text{Densidad celular} = \frac{No.de\ Células}{Volumen} = \frac{No.de\ Células}{0.02\mu L}\ x\ \frac{1000\mu L}{mL} = \frac{No.de\ Células\ x\ 50{,}000}{mL} \qquad (1)$$

2.6.- Curva de crecimiento

Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo en el fotobiorreactor tronco-cónico y en matraces Celstir con 1L y 250 mL de medio TAP respectivamente. Se tomaron muestras de 5 mL y 500 µL cada 24 horas, respectivamente, hasta alcanzar la fase de muerte celular. Se determinó la concentración celular con respecto al tiempo y el peso seco de la biomasa al final de la fase exponencial.

2.7.-Esterilizacion del fotobiorreactor de 1 L

Se esterilizó el fotobiorreactor por medio de una limpieza química con una solución de Hipoclorito de Sodio (60 % v/v), se enjuagó con agua destilada estéril dentro de una campana de flujo laminar, posteriormente se colocó a rayos UV por 1.5 horas, pasado el tiempo se procedió a llenar el reactor con 900 mL de medio TAP (estéril) y se inoculó con 10 % v/v (974.43 x 10^6 células·mL^{-1}).

2.8.-Limitación de Nitrógeno

Para evaluar el efecto de la limitación de Nitrógeno tanto en los matraces Celstir de 250 mL como en los fotobiorreactores tronco-cónicos, al final de la fase exponencial y omitiendo el paso de recuperación de biomasa para el cambio de medio, se agregó 20 mL de medio TAP concentrado al cultivo con medio de crecimiento agotado omitiendo la fuente de Nitrógeno proporcionada por el NH_4Cl. El cálculo de las concentraciones de todos los constituyentes en los 20 mL de medio TAP concentrado permite obtener las mismas concentraciones del medio TAP 1X una vez que se hace la dilución en el medio gastado. Posteriormente, se incubaron a una temperatura de 25 ±2 °C con un fotoperiodo de 16:8 horas (luz/oscuridad). Cabe señalar que a la solución stock de metales traza de Hutner no se le eliminó el contenido de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$, proporcionando una concentración de Nitrógeno de 0.011 $mg\cdot L^{-1}$.

2.9.-Pruebas de intensidad luminosa

Para evaluar el efecto de diferentes intensidades luminosas en el contenido lipídico de la especie *Scenedesmus* sp, se efectuaron cultivos en matraces Celstir de 250 mL con limitación de Nitrógeno a intensidades de 30, 80 y 100 $\mu mol\cdot m^{-2}\cdot s^{-1}$. Se recuperó la biomasa, se realizaron las extracciones lipídicas y se determinó el perfil lipídico bajo estas condiciones.

2.10.-Recolección y productividad de biomasa

La recuperación de biomasa de los cultivos en matraces Celstir de 250 mL, se llevó a cabo utilizando una centrífuga Eppendorf® modelo 5804 R a 4,000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. La biomasa se congeló a -80 °C por 24 horas y se deshidrató en una liofilizadora Labconco Modelo 77530 por 24 horas. La biomasa seca se pesó en una balanza analítica Scientech® ZSA 210. La biomasa proveniente del fotobiorreactor tronco-cónico se recuperó mediante sedimentación por gravedad para luego ser tratada en la era de secado.

La productividad de biomasa ($mg\cdot L^{-1}\cdot d^{-1}$) fue calculada de la variación de la biomasa por unidad de volumen, con respecto al tiempo, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P = (X_1 - X_0)(t_1 - t_0)^{-1} \qquad (2)$$

Donde X_1 y X_0 son las concentraciones de la biomasa (mg $\cdot L^{-1}$) con respecto al día de cultivo t_1 y t_0 respectivamente.

2.11.-Deshidratación de la biomasa microalgal.

La biomasa sedimentada recuperada del fotobiorreactor tronco-cónico (lodo microalgal) se secó por medio de una era de secado. Esto se efectuó esparciendo el lodo microalgal en un filtro de retención colocado sobre una cama de arena-grava durante 4 días a una temperatura de 25 ± 2 °C. La biomasa seca se pesó en una balanza analítica Scientech® ZSA 210.

2.12.-Extracción de lípidos

Los lípidos totales se extrajeron mediante lixiviación con una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 v/v, añadiendo 15 mL de la mezcla de solventes por cada 38 mg de biomasa seca empleada. Las extracciones se efectuaron en matraces de 50 mL, los cuales fueron colocados en una incubadora "ZHWY-200B" a 150 rpm y una temperatura de 38 °C durante 3 horas [105]. La extracción se realizó tres veces. A continuación se recuperó el lixiviado, se evaporaron los solventes en un evaporador rotatorio Ika® RV10 digital, se secó el extracto lipídico a 60 °C por una hora y se pesó la muestra.

La productividad de lípidos (mg$\cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$) se calculó como se mencionó anteriormente.

2.13.-Cromatografía de capa fina

Para determinar la presencia de los lípidos contenidos en el extracto, se utilizó la técnica de cromatografía de capa fina. Para ello se empleó una placa de gel de sílice como fase estacionaria (cromatofolios Merck®). La fase móvil utilizada fue una mezcla de hexano, acetato de etilo y ácido acético en una proporción 9:1:0.1 (v/v) y, finalmente la placa se reveló con una solución de ácido fosfomolíbdico en una campana de extracción.

2.14.-Transesterificación

El extracto crudo de lípidos se disolvió en 2 mL de n-heptano y se tomó una alícuota de 500 mL, que se guardó para su empleo posteriormente como referencia. A los 1.5 mL restantes del extracto se le añadió 300 µL de metóxido de sodio al 2 % y 300 µL de acetato de etilo. Finalmente, la mezcla se colocó en un baño María a una temperatura de 60 °C por 1.5 horas en agitación. Las muestras transesterificadas se pasaron por una columna de zeolita.

2.15.-Análisis por cromatografía de gases.

El análisis por cromatografía de gases se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer modelo Clarus 500 equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna Varian Capillary Column Select ^{TM} Biodiesel for FAME (30m x 0.32 mm D.I x 0.25 µm de espesor de columna). Se empleó el siguiente programa de temperatura: se inició el proceso con una temperatura inicial del horno de 180°C durante 2 min; posteriormente, se calentó el horno a una velocidad de 5°C/min hasta 250 °C, esta temperatura se mantuvo por 25 min. La temperatura del inyector se conservó a 270 °C mientras que el detector FID se mantuvo a una temperatura de 300 °C. Se utilizó Nitrógeno (7 psi) como gas acarreador a un flujo constante de 80 $mL \cdot min^{-1}$. El volumen de inyección de la muestra fue de 1 µL. Los siguientes estándares se utilizaron para la cuantificación de los ésteres metílicos obtenidos: éster metílico del ácido mirístico, éster metílico del ácido palmítico, éster metílico del ácido esteárico, éster metílico del ácido oleico y el éster metílico del ácido linoleico, utilizando la técnica del estándar externo [106].

2.16.- Fotobiorreactor escala laboratorio de 1L

Para el fotobiorreactor tronco-cónico se empleó como base de diseño la columna de burbujeo circular (BC2) de Chisti [18]; posteriormente, se realizaron las modificaciones pertinentes que se presentan en la Figura 2.3.

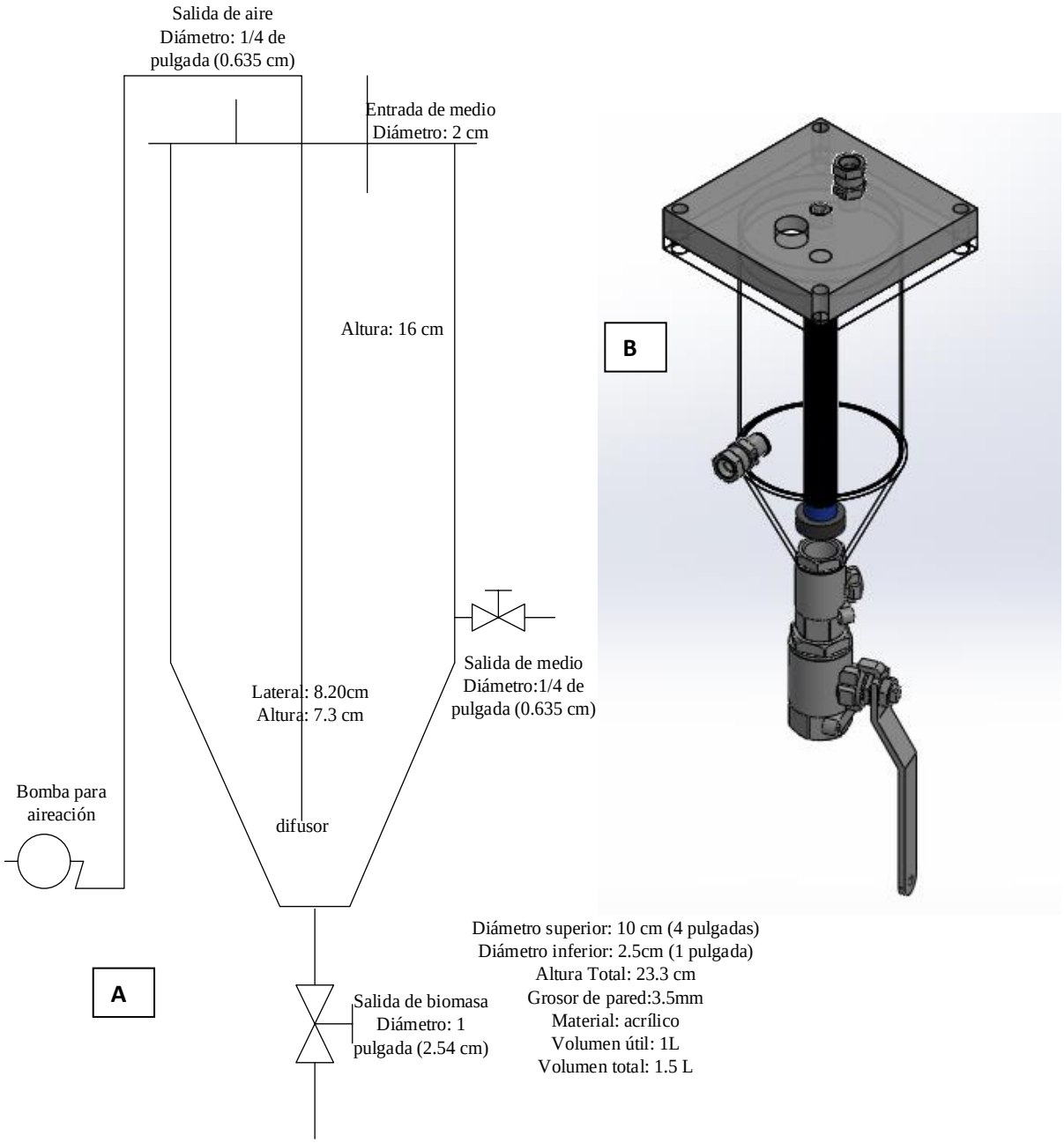


Figura 2. 1.- Esquema del fotobiorreactor (A) y versión 3D del diseño en Solidworks (B)

2.16.1.-Aireación /Agitación

Se empleó una bomba ELITE® 800 que proporcionó un flujo de aire de 1.6 vvm, permitiendo la agitación y aireación constante del medio.

Figura 2.2.-Modelo de bomba.

2.16.2.-Iluminación

Se dispuso de dos lámparas fluorescentes de 24 W a cada lado del fotobiorreactor (Figura 2.5), las cuales fueron sostenidas por una estructura circular que las fijó a una distancia de 5 cm de la pared del reactor. Las lámparas proporcionaron una intensidad lumínica de 81 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ en las paredes laterales del reactor y de 38 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ en el interior del mismo.

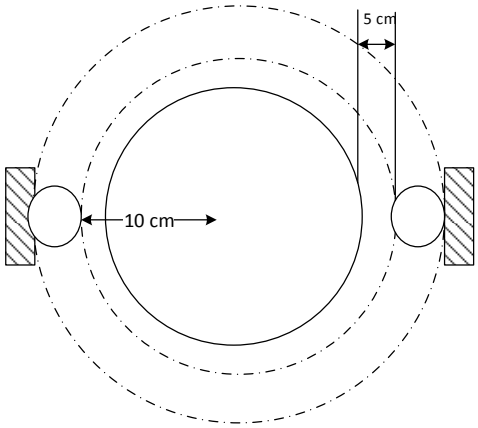


Figura 2.3.-Montaje de lámparas.

2.17.-Diseño de la era de secado

Para el diseño de la era de secado se empleó el método planteado por Swanwick [102] el cual se describe en el Anexo III. Se construyeron 3 eras de secado, con una área de 81 cm^2, una cama de arena (Ø de partícula 0.3 a 12 mm) de 2 cm de altura, una cama de grava (Ø de partícula 3 a 25 mm) de 18 cm de altura y un fondo falso de 2 cm que conecta con una manguera que permite la salida del líquido filtrado proveniente de la biomasa (Figura 2.6

A). Para evitar la mezcla de la biomasa con la arena, se colocó un filtro de retención constituido por una tela denominada comercialmente “black out” (Figura 2.6 B-C).

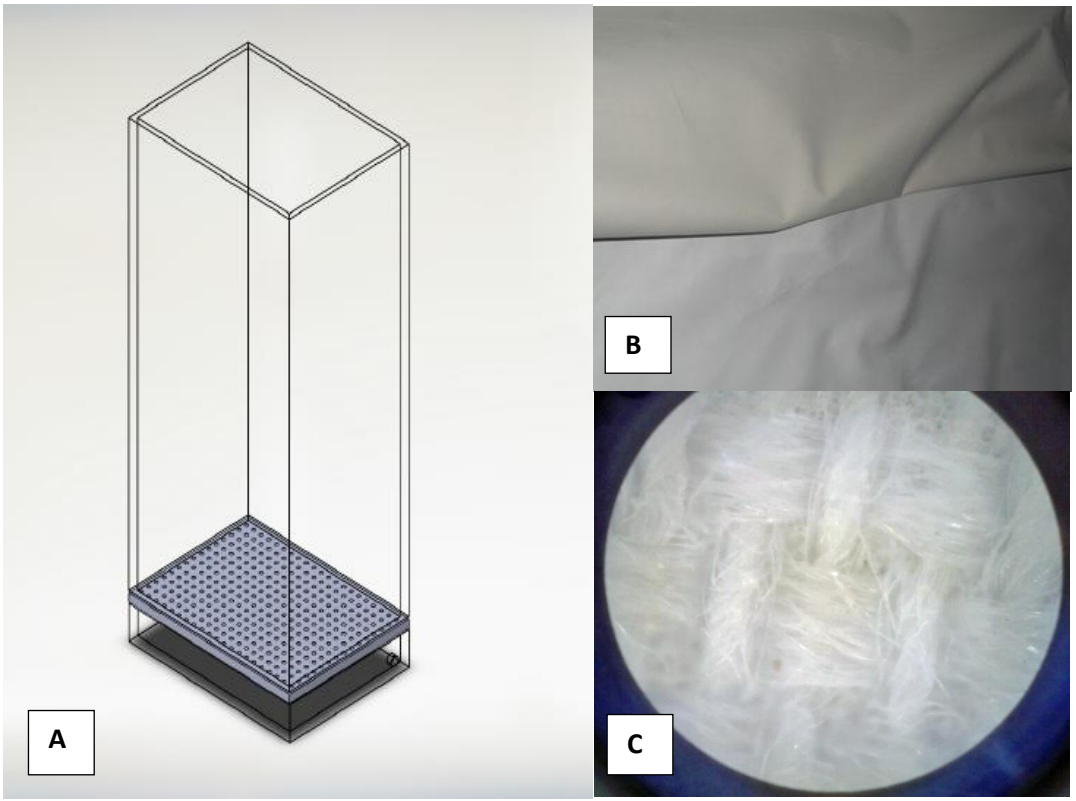


Figura 2.4.- A) Esquema de la era de secado en Solidworks 2013, **B)** Filtro de retención, nombre comercial: Tela black out, **C)** Vista de la tela black out en Microscopio Estereoscópico en la que se puede observar el entretejido de las fibras.

El objetivo de emplear el filtro de retención es evitar la pérdida de biomasa, debido a que la especie presenta tamaños de 8.522 µm de alto y 6.539 µm de ancho, así como evitar la mezcla de arena y biomasa para una adecuada separación. La tela black out presenta un tiempo de vida de hasta 10 años.

2.18.-Eficiencia del equipo.

La eficiencia del equipo se determinó con base al porcentaje de humedad removida empleando la fórmula 3 [107]

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(M_1 - M_2)}{M} \text{ X } 100 \qquad (3)$$

Donde:

- M1=Peso de crisol + Muestra húmeda.
- M2=Peso del crisol + Muestra Seca.
- M=Peso de la muestra húmeda

2.19.-Análisis estadístico.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado (excepto si se indica lo contrario). El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) con el software Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Estados Unidos) utilizando un valor p = 0.95.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- Curva de crecimiento en matraces Celstir de 250 mL

Se realizaron cultivos de la microalga *Scenedesmus* sp. en reactores Celstir de 250 mL (Figura 3.1) para conocer el comportamiento de la cepa en estos equipos, ya que éstos son el paso intermedio entre el matraz Erlenmeyer y el fotobiorreactor tronco-cónico.

Figura 3.1.-Matraz Celstir de 250 mL.

En la Figura 3.2 se observa la curva de crecimiento obtenida en los matraces Celstir en medio TAP.

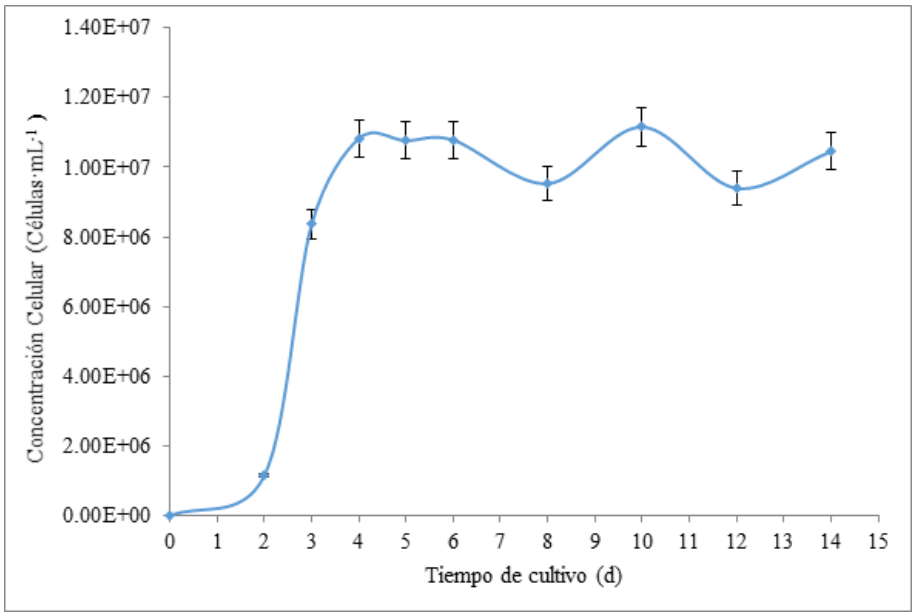


Figura 3.2.-Curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. en matraces Celstir de 250 mL.

La curva de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. observada en la figura anterior, muestra una fase de adaptación de un día, posteriormente del segundo al cuarto día una fase exponencial de crecimiento para después dar inicio a una fase estacionaria que se mantiene hasta el día 14 de cultivo. La cepa alcanza su máxima densidad celular de 10.82 x 10^6 células·mL^{-1} al cuarto día de cultivo. Se ha encontrado que cepas como *Scenedesmus acutus* no superan una densidad celular de 5 x 10^6 células·mL^{-1}, con un inicio de fase estacionaria a los 10 días de cultivo [108]. *Scenedesmus abundans* bajo condiciones autótrofas y una concentración del 0.1% (p/v) de nitrato de amonio presentó una concentración celular de 4 x 10^6 células·mL^{-1} como densidad celular máxima [109].

El objetivo del presente experimento fue determinar el inicio de la fase estacionaria ya que es el tiempo cuando se puede iniciar la limitación de Nitrógeno. La decisión de no cambiar el medio de cultivo sino adicionar nutrientes nuevamente (sin adicionar la fuente de nitrógeno), se debió a que se quiere evitar el proceso de centrifugación para el cambio de medio. En cultivos que presentan un volumen importante, el realizar una cosecha intermedia por medio de centrifugación, sería altamente costoso. Algunas centrífugas empleadas en la cosecha de microalgas como *Scenedesmus, Coelastrum y Skeletonema* han sido:

- inyector centrífugo con un consumo energético de 0.8 Kwh·m^{-3}

- centrífuga de placa de separación con un gasto de 1 $kWh \cdot m^{-3}$
- centrífuga de tornillo que emplea 8 $kWh \cdot m^{-3}$ de energía
- hidrociclones que utilizan 0.3 $kWh \cdot m^{-3}$ de potencia.

A pesar de que estos equipos tienen una alta eficiencia de recolección de biomasa (80-90 %) con tiempos de recuperación de 2-5 min [85], presentan altos consumos energéticos limitando su viabilidad industrial [17].

3.2.-Pruebas de limitación de Nitrógeno en matraces Celstir de 250 mL.

Se efectuaron pruebas de limitación de Nitrógeno considerando los datos obtenidos a partir de la Figura 3.2, de la siguiente manera: se llevaron a cabo seis cultivos en matraces Celstir con medio TAP a una concentración inicial de 10,000 $células \cdot mL^{-1}$. Dos matraces se cosecharon al quinto día de la etapa estacionaria para determinar su contenido lipídico, posteriormente los demás matraces se sometieron a limitación de Nitrógeno. Al octavo día de limitación, es decir, al treceavo día de cultivo (etapa temprana de la fase estacionaria) se cosecharon otros dos matraces y se determinó el contenido lipídico a este tiempo. Finalmente se cosecharon los últimos dos matraces a los dieciséis días de limitación, es decir, al día veintiuno de cultivo (etapa tardía de la fase estacionaria) y se determinó el contenido lipídico en ese tiempo.

En la figura 3.3 se muestran los valores de la concentración celular obtenida en las diferentes etapas en las que se llevó a cabo el experimento. El análisis estadístico indicó que no existe una diferencia significativa entre los cultivos antes o después de la limitación de Nitrógeno. Los valores obtenidos fueron 12.5×10^6, 9.1×10^6 y 10.8×10^6 $células \cdot mL^{-1}$, a los 5, 13 y 21 días de cultivo respectivamente.

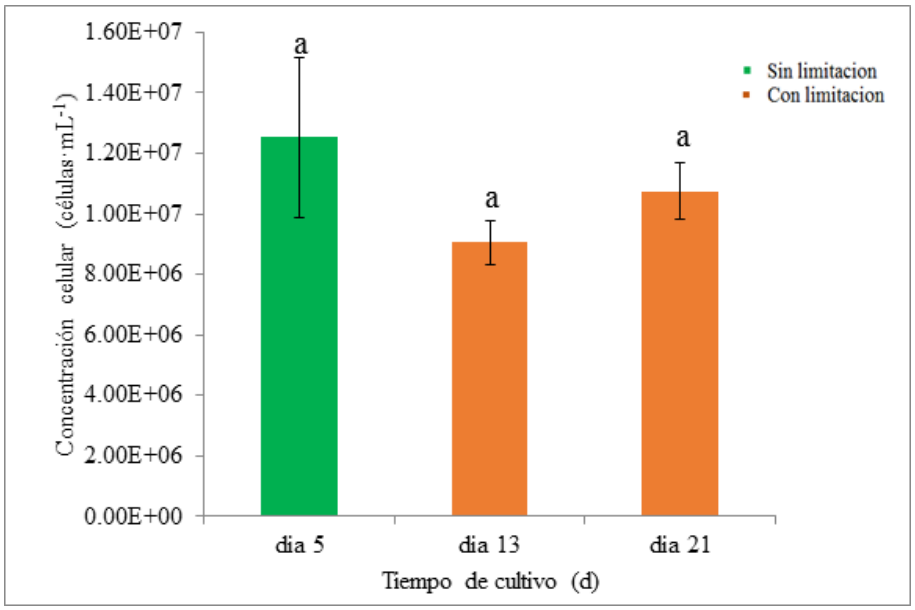


Figura 3.3.-Concentración celular de la microalga *Scenedesmus* sp. en matraces Celstir de 250 mL bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas.

En la literatura sobre limitación de Nitrógeno, se reporta que bajo este procedimiento se presenta una disminución en la división celular [110], por ejemplo *Chlorella vulgaris* bajo deficiencia de nutrientes como N_2 presenta una disminución de una sexta parte de su densidad celular. Por otra parte, *Scenedesmus acutus* presenta una reducción del 50 % de su densidad celular bajo deficiencia de nitrógeno [108]. Especies como *Neochloris oleoabundans* bajo concentraciones de nitrógeno de 30, 15 y 10 mg·L^{-1} presentan concentraciones de 28.12 x 10^6, 16.47 x 10^6 y 13.27 x 10^6 células·mL^{-1} respectivamente. Este nutriente juega un papel importante en la acumulación lipídica pero por otro lado reduce gradualmente la densidad celular en algunas microalgas [111]. Sin embargo, la microalga *Scenedesmus* sp empleada en este estudio no presentó una disminución significativa de crecimiento en comparación con el inicio del tratamiento. Existen algunas especies como *Chlorella minutissina* que incluso presentan un aumento en su concentración celular bajo incubación con limitación de Nitrógeno [112].

3.2.1.-Produccion de biomasa en matraces Celstir de 250 mL

Se alcanzó una producción de biomasa de 0.52, 1.14 y 1.24 $g \cdot L^{-1}$ a los 5, 13 y 21 días de cultivo respectivamente, como se presenta en la Figura 3.4.

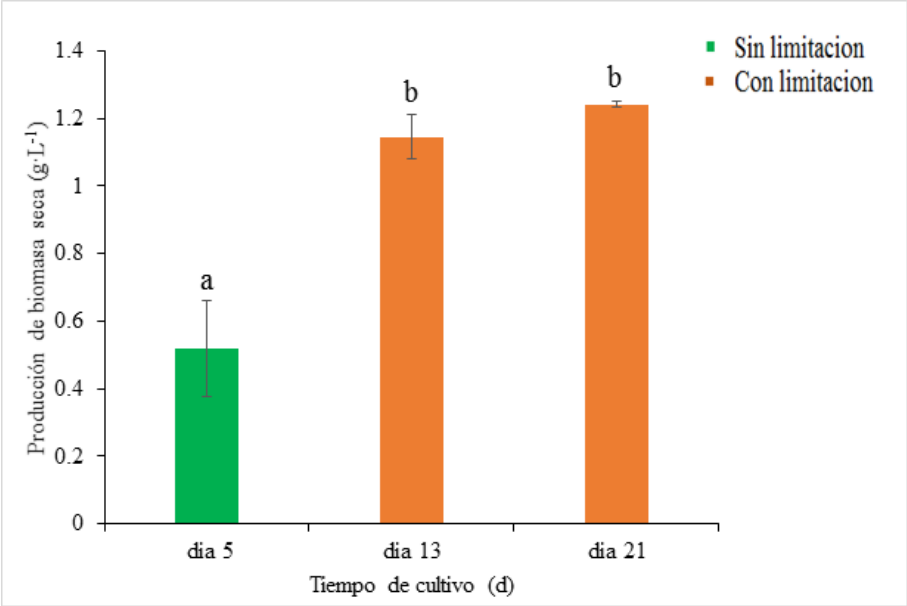


Figura 3.4.-Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. en matraces Celstir de 250 mL bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas.

Como indica la gráfica anterior, la biomasa colectada en el quinto día presenta una diferencia significativa en comparación con los días trece y veintiuno. Esto se debió a que la cepa sometida al tratamiento con el medio de limitación de Nitrógeno entró en un estado de estrés que conllevó a la célula a acumular metabolitos, provocando que ésta presente un mayor peso en comparación con la muestra tomada antes de la limitación de Nitrógeno. En limitación de Nitrógeno, algunas microalgas tienden a disminuir su producción de biomasa, por ejemplo, cultivos de *Nannochloropsis*, bajo limitación de N_2, alcanzan contenidos lipídicos de un 60% para el cuarto día de cultivo reduciendo hasta en un 15 % su contenido de biomasa [15]. Se ha reportado que *Chlorella vulgaris* empleando NO_3 como fuente de nitrógeno presentó una densidad máxima de biomasa de 250 $mg \cdot L^{-1}$ mientras que en ausencia de NO_3 la densidad máxima de biomasa fue de 315 $mg \cdot L^{-1}$. Bajo limitación de nitrógeno, esta especie presentó un aumento en la densidad de biomasa [113], similar a lo observado en este trabajo. También es el caso de *Chlorella emeronii* que aumentó tres

veces su contenido de biomasa al final de su cultivo, y de *Chlorella protothecoides* que presentó un aumento de contenido de biomasa y en su contenido de lípidos (11-23 %) bajo limitación de Nitrógeno [114].

3.2.2.-Contenido lipídico en matraces Celstir de 250 mL

La producción lipídica se muestra en la figura 3.5. Se presentó un aumento en el contenido de lípidos durante la parte final de la limitación de nitrógeno. Se observó una diferencia significativa entre el tratamiento con limitación de Nitrógeno al día veintiuno en comparación con los días quinto y treceavo del cultivo. Los valores obtenidos de producción lipídica son 0.243, 0.445 y 0.537 $g \cdot L^{-1}$ a los días 5, 13 y 21 de cultivo respectivamente.

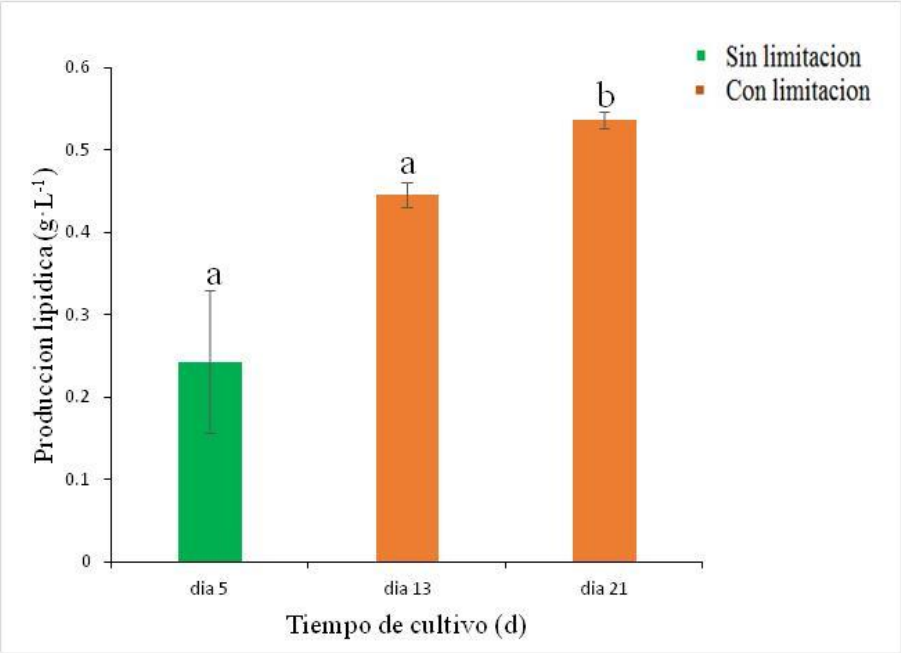


Figura 3.5.-Producción lipídica de la microalga *Scenedesmus* sp. en matraces Celstir de 250 mL bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas.

Algunas especies como *Scenedesmus dimorphus* cultivada en frascos de 1 L a intensidades de 200 µmol foton$\cdot m^{-2}s^{-1}$ en concentraciones de nitrógeno que disminuyen de 344 $mg \cdot L^{-1}$ a 86 $mg \cdot L^{-1}$ presentan una producción lipídica de 0.18 $g \cdot L^{-1}$ [115]. Bajo condiciones

deficientes de N_2 especies como *Ankistrodesmus falatus, Chlorella vulgaris, Neochloris oleoabundans, Scenedesmus sp., Cylindrotheca fusiformis, Isochrysis C4, Nannochloropsis sp., Pavlova sp., Phaeodactylum tricornutum, Tetraselmis suecica y Spirulina platensis* presentan productividades de 397, 597, 428, 649, 366, 235, 471, 122, 406, 259, 23 $mg \cdot L^{-1}$ respectivamente bajo 14 días de crecimiento [116].

El contenido lipídico expresado como % del peso seco se muestra en la figura 3.6. Los valores obtenidos fueron de 46.38, 38.94 y 43.28 %, a los 5, 13 y 21 días de cultivo, respectivamente. Se puede observar que la limitación de Nitrógeno no produce un efecto significativo en el contenido lipídico.

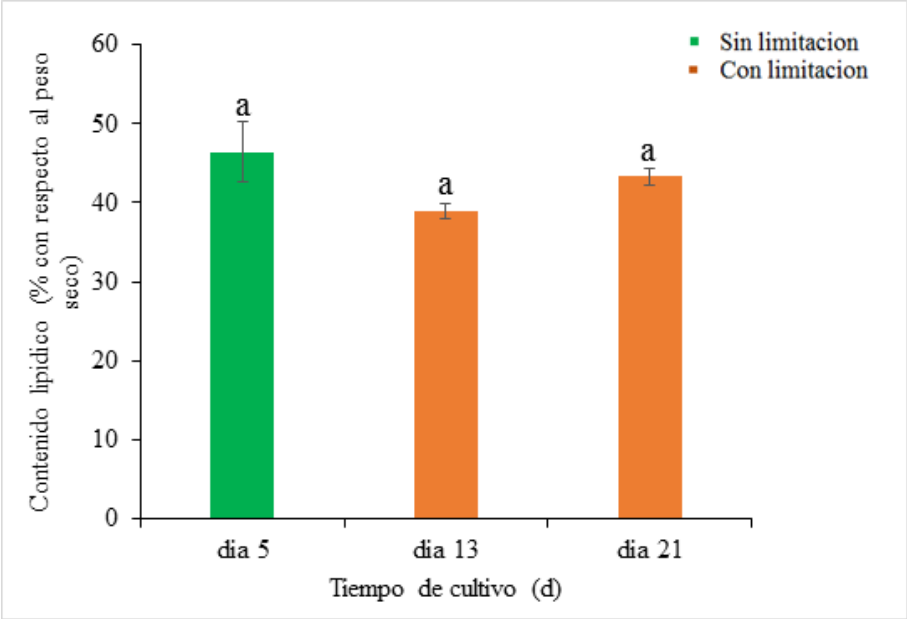


Figura 3.6.-Contenido lipídico (%) de la microalga *Scenedesmus* sp. en matraces Celstir de 250 mL bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representa diferencias significativas.

Us *et al*. [117] realizaron experimentos de limitación de nitrógeno en dos etapas por 5 días con la microalga *Scenedesmus* sp en los que el contenido lipídico aumentó ligeramente de 33.2 a 42.97%. Estos valores son similares a los obtenidos en el presente trabajo. También se ha reportado que la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* presenta un aumento en el contenido de lípidos polares de un 20 a un 55.7 % bajo limitación de Nitrógeno [118]. En resumen, la limitación de nitrógeno provocó que las células aumentaran en peso pero no en

número. Y este peso se debió a la producción de lípidos y otros compuestos celulares en igual proporción.

3.2.3.-Perfil lipídico en matraces Celstir de 250 mL

Se determinó el perfil lipídico por medio de cromatografía de gases, los resultados se presentan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1.- Perfiles lipídicos (%) en matraces Celstir de 250 mL.

Ester metílico	Inicio de fase estacionaria (5 días)	8 días después del inicio de la fase estacionara (13 días)	16 días después del inicio de la fase estacionara (21 días)
C14:0	19.59	11.71	11.83
C16:0	9.87	38.63	35.41
C18:0	47.44	4.59	4.40
C18:1	0	1.64	3.28
C18:2	23.08	43.40	45.07

Se puede observar en el perfil lipídico que corresponde a la muestra del día 5 (inicio de la fase estacionaria), la ausencia del ácido graso C18:1, deseable para la producción de biodiesel. Después de 8 días en limitación de nitrógeno, se pudo observar un aumento de aproximadamente 4 veces en el porcentaje de C16:0 a la vez que el porcentaje de C18:0 disminuyó aproximadamente 10 veces. El porcentaje de C18:2 aumentó el doble con el tratamiento de limitación de nitrógeno. Globalmente, la limitación de nitrógeno provoca que el porcentaje de ácidos grasos insaturados aumente con el tiempo, lo cual es recomendable para obtener un biodiesel de buena calidad.

El contenido de ácidos grasos y la calidad de éstos dependen de la etapa en la que se realiza la limitación y de las condiciones del cultivo: pH, temperatura e intensidad luminosa, en las que crecen los microorganismos [19]. La mayor cantidad de los lípidos transesterificables se encuentran durante la fase estacionaria del cultivo y éstos pueden aumentar bajo diferentes tipos de estrés [119]. Es necesario realizar más estudios para poder explicar el

mecanismo mediante el cual se presentan los cambios en el perfil de lípidos con la limitación, tanto desde el punto de vista biológico como químico.

Especies como *Neochloris oleoabundans*, bajo limitación de Nitrógeno, presentan perfiles lipídicos compuestos principalmente por C16:0 (17.9%), C18:0 (11.1%), C18:1 (42.5 %) y C18:2 (15.6%) [120]. Por otra parte, *Chlorococcum ellipsoideum*, *C. nivale*, *C. tatrense* y *Scenedesmus desertícola*, bajo deficiencia de nitrógeno presentan perfiles lipídicos compuestos principalmente por C16:0 (18.3, 23.8, 17.9 y 14.9 %), C18:1 (35.6, 39.2, 32.3 y 42.3 %) y C18:2 (15.3, 6.8, 16.9 y 13 %) [121]. Si comparamos el perfil lipídico de *Scenedesmus desertícola* con *Scenedesmus* sp (este trabajo), se puede observar en esta última la presencia de C14:0 y un menor porcentaje de C18:1.

3.3.-Pruebas de intensidad luminosa en matraces Celstir de 250 mL

La literatura sobre cultivos de microalgas del genero *Scenedesmus*, indica que bajo un estrés luminoso y limitación de Nitrógeno, es posible aumentar el contenido lipídico de la especie. Se seleccionaron 3 intensidades luminosas (30, 80 y 100 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) y se procedió a la realización de los experimentos bajo 8 días de limitación de Nitrógeno. Los resultados se presentan a continuación.

3.3.1.-Biomasa seca.

La producción de biomasa fue de 1.39, 1.28 y 1.38 $g \cdot L^{-1}$, bajo intensidades luminosas de 30, 80 y 100 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, respectivamente, como se puede observar en la Figura 3.7.

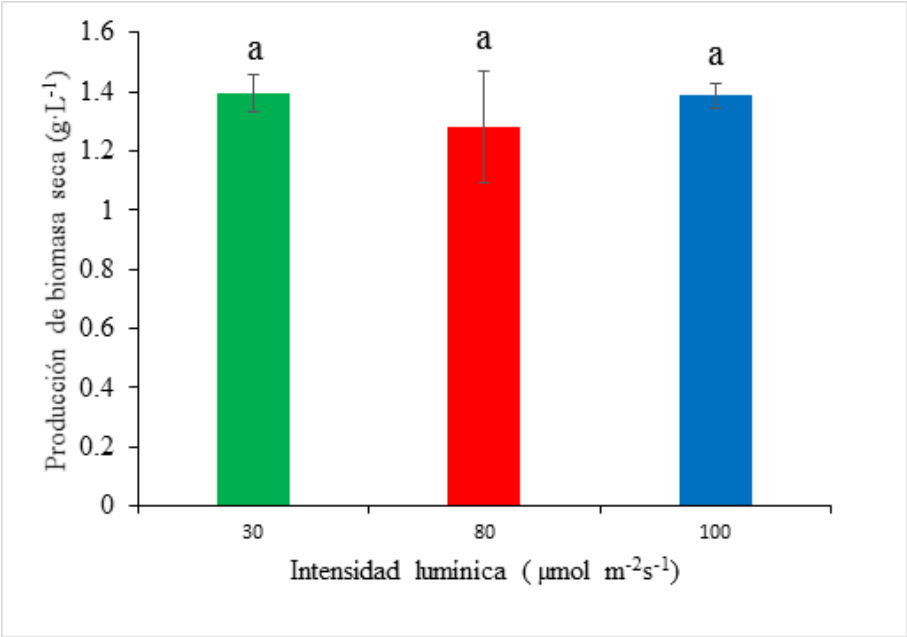


Figura 3.7.-Producción de biomasa seca de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo diferentes intensidades lumínicas. Letras diferentes representan diferencias significativas.

Especies como *Scenedesmus dimorphus* presentan un aumento en el crecimiento de manera lineal a intensidades de 50-510 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ y a concentraciones de 100 $mg \cdot L^{-1}$ de Nitrógeno [122], mientras que a 510 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ alcanzan un punto de saturación de luz deteniendo el crecimiento del cultivo. Otros géneros de *Scenedesmus* presentan una tasa de crecimiento máxima bajo diferentes concentraciones de Nitrógeno a 400 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, siendo en este punto la limitación de Nitrógeno un factor importante en el crecimiento del cultivo [123]. Para la cepa *Scenedesmus* sp, empleada en este estudio, no se observó un incremento significativo de biomasa al incrementar la intensidad luminosa hasta casi 3 veces.

3.3.2.-Contenido lipídico.

Los valores de la productividad lipídica fueron 0.62, 0.65 y 0.50 $g \cdot L^{-1}$ bajo intensidades luminosas de 30, 80 y 100 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$, respectivamente como se puede observar en la Figura 3.8, y los porcentajes del contenido lipídico fueron de 44.95, 49.47 y 36.14 %, como se puede apreciar en la Figura 3.9.

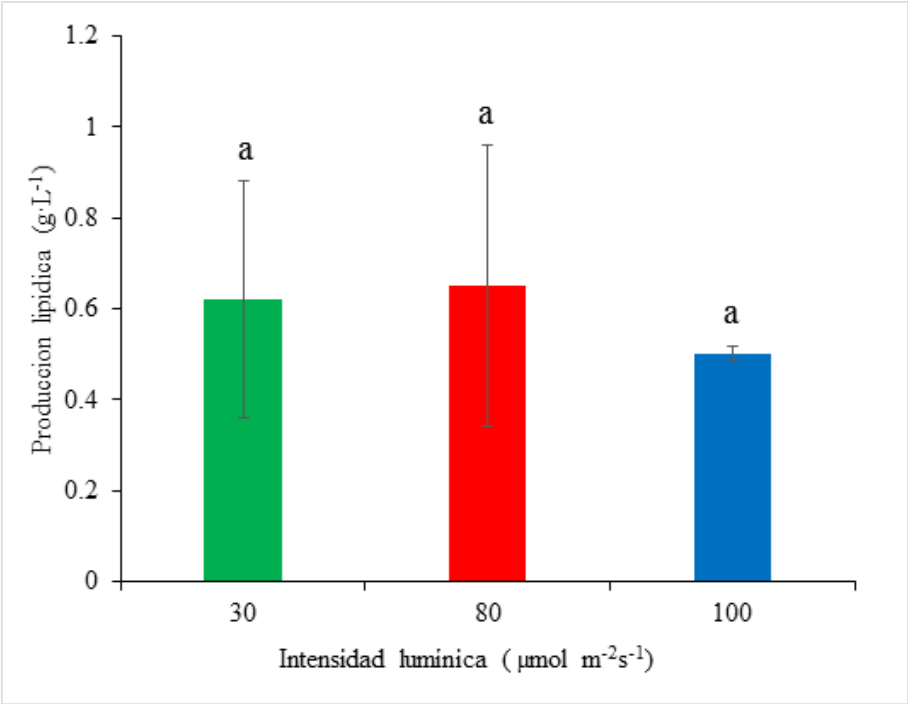


Figura 3.8.-Producción lipídica de la microalga *Scenedesmus* sp., en medio TAP bajo diferentes intensidades lumínicas. Letras diferentes representan diferencias significativas.

El extracto crudo obtenido en cada extracción no presentó una diferencia significa, mientras que el rendimiento se mantuvo aproximadamente en promedio de 43.5 %.

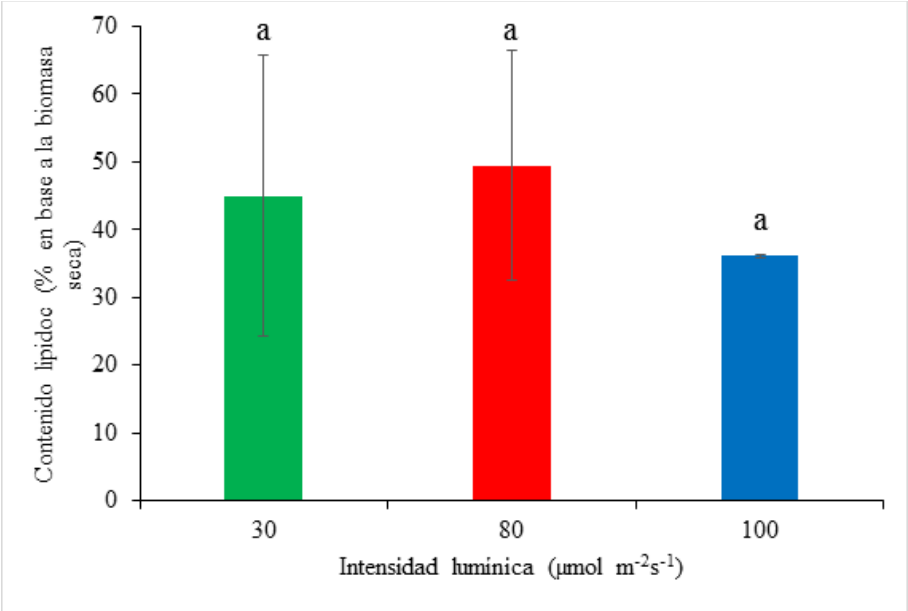


Figura 3.9.-Rendimiento lipídico de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo diferentes intensidades lumínicas. Letras diferentes representan diferencias significativas.

Se ha reportado [122] que la microalga *Scenedesmus dimorphus* presentan un aumento lineal en el contenido lipídico al aumentar la intensidad luminosa de 50 a 1200 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, mientras que a intensidades menores a 50 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ostentan una mayor acumulación de almidón. Géneros de *Scenedesmus* pueden aumentar su contenido lipídico en intervalos de intensidad lumínica que van de 250 a 400 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ en limitación de nitrógeno de hasta 12 días [123]. La especie *Scenedesmus* sp. utilizada en este estudio no presentó un aumento en su contenido lipídico tal vez debido a que las intensidades no fueron suficientemente altas.

3.3.3.-Perfil lipídico.

En la tabla 3.2 se puede observar el perfil lipídico de la especie *Scenedesmus* sp bajo diferentes intensidades luminosas. No se observó un cambio significativo en el perfil lipídico de la cepa de estudio dentro del rango de intensidad luminosa aplicado.

Tabla 3.2.- Perfil de lípidos (%) a diferentes intensidades luminosas.

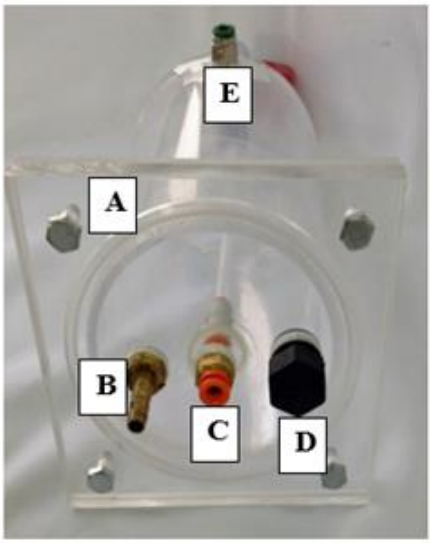
	Perfil de lípidos (%)		
Ester metílico	30 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	80 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$	100 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$
C14:0	2.49	1.74	2.29
C16:0	36.69	31.33	29.59
C18:0	6.55	3.52	4.77
C18:1	27.18	28.80	31.96
C18:2	27.08	34.61	31.39

Algunas especies de *Scenedesmus* presentan un aumento en el contenido de lípidos neutros bajo una alta limitación de Nitrógeno e intensidades luminosas de 250-400 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ con tiempos de limitación de hasta 12 días, bajo estas condiciones los lípidos neutros fueron (C16:0) 24-27%, (C18:1) 43-52%, y (C18:2) con 7-11 % [123].

3.4.-Construcción y montaje del fotobiorreactor tronco-cónico.

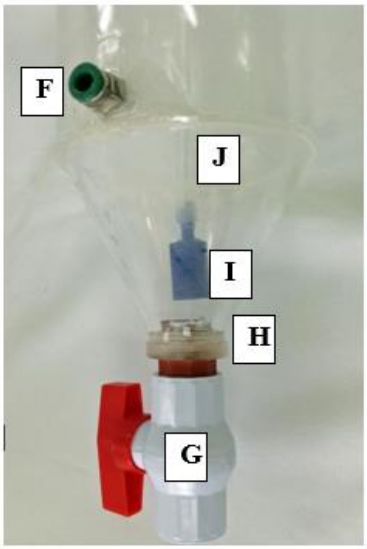
El fotobiorreactor tronco-cónico se construyó a partir de un tubo de acrílico con un diámetro de 10 cm y un grosor de pared de 3 mm. La figura 3.10 muestra una imagen del fotobiorreactor mientras que las figuras 3.11 y 3.12 presentan esquemas del equipo.

Figura 3.10.- Fotobiorreactor de 1L



Partes superior del reactor	
A	Tapa superior
B	Salida de aire
C	Entrada de aire
D	Entrada de medio e inóculo
E	Salida de medio libre de células microalgales

Figura 3.11.- Vista de superior del fotobiorreactor



Parte inferior del reactor	
F	Salida lateral de medio
G	Válvula de paso
H	Salida de biomasa
I	Difusor (piedra difusora)
J	Tubo de aireación

Figura 3.12.-Vista inferior del fotobiorreactor

Durante el arranque se presentaron dos problemas, el primero fue el hecho de que la cantidad de inóculo (10,000 células·mL^{-1}) no fue la suficiente para evitar la contaminación por bacterias y el segundo problema, fue debido al difusor de piedra porosa, el cual no lograba una aireación/agitación adecuada, provocando que la biomasa sedimentara.

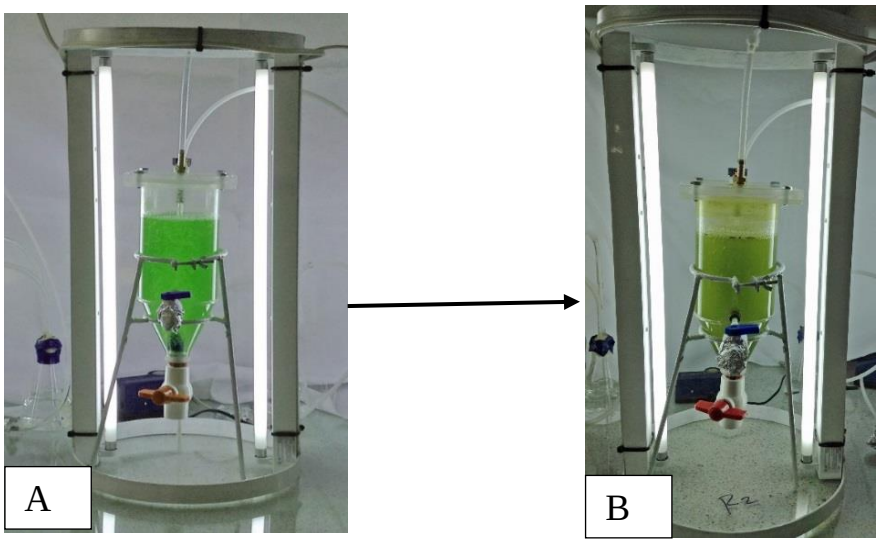


Figura 3.13.-Montaje del fotobiorreactor. A) inicio de la prueba, B) después de 2 días de cultivo se observa una alta contaminación.

Para reducir la posibilidad de contaminación, se realizaron experimentos previos y se determinó que un porcentaje de inóculo del 10 % v/v (974.43 x 10^6 células·mL^{-1}) reduce la contaminación en el cultivo. Aumentando la carga de inóculo se pudo contener la contaminación sin necesidad de esterilizar el reactor con vapor, aunque el medio si fue esterilizado.

3.4.1.-Pruebas de aireación del reactor.

Primero se probó un difusor comercial de tipo piedra porosa, de los que se utilizan en las peceras. Se pudo observar que las burbujas salían por la pared lateral del difusor propiciando que hubiera sedimentación de la biomasa. Debido a esto, se cubrió el difusor con una cinta llamada Thermofit, dejando libre solamente la parte inferior del difusor, por donde salían las burbujas. Se observó que la agitación fue adecuada ya que no sedimentó la biomasa. Finalmente se probó un difusor de los que se utilizan en los equipos de HPLC para desgasificar los solventes, pero se observó que las burbujas eran muy pequeñas y la agitación no era mejor que el difusor con thermofit. Los tres tipos de difusor se muestran en la figura 3.14

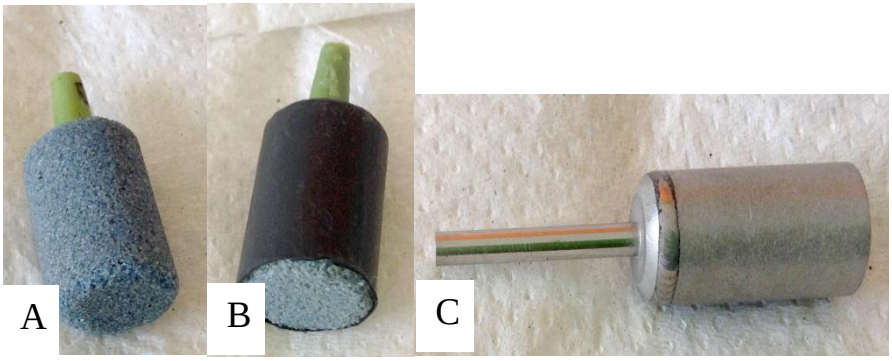


Figura 3.14.-Difusores empleados en este trabajo. A) tipo piedra porosa sin Thermofit, B) piedra porosa con Thermofit, C) Difusor de HPLC.

Se llevaron a cabo curvas de crecimiento utilizando cada una de las configuraciones de difusor (Fig. 3.15) para determinar el adecuado.

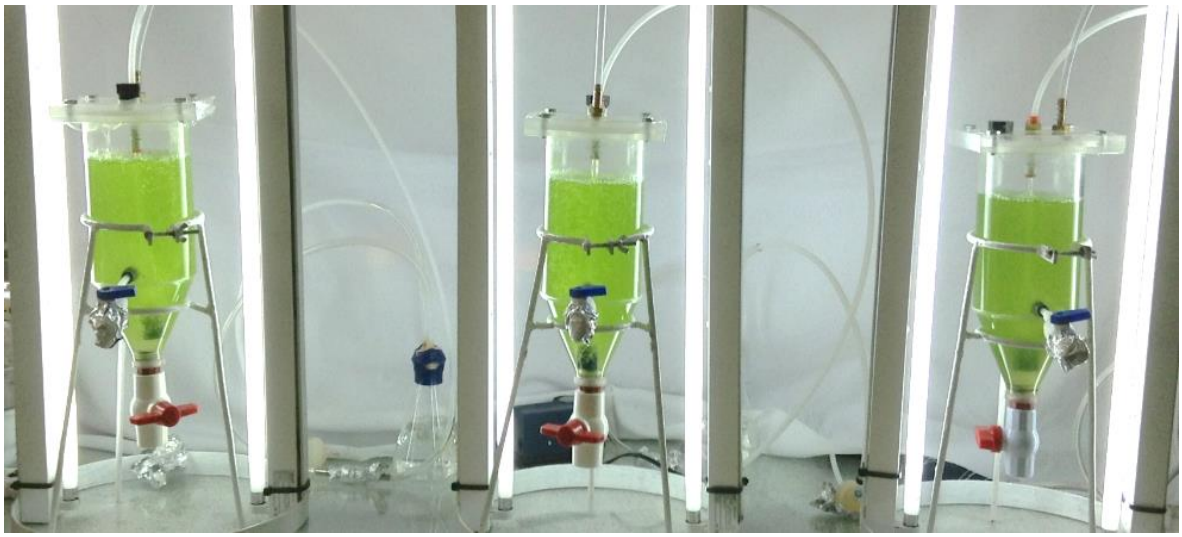


Figura 3 15. Fotobiorreactores en pruebas de aireación.

En la Figura 3.16 se puede observar las curvas de crecimiento obtenidas utilizando las tres diferentes configuraciones de difusores.

El fotobiorreactor equipado con un difusor tipo piedra porosa sin Thermofit presentó una etapa de crecimiento exponencial de tres días. Para el cuarto día el cultivo entró a una etapa estacionaria alcanzando su mayor concentración celular de 2.258 x 10^7 células·mL^{-1} e inmediatamente inició una fase de decaimiento que se aceleró al octavo día de cultivo.

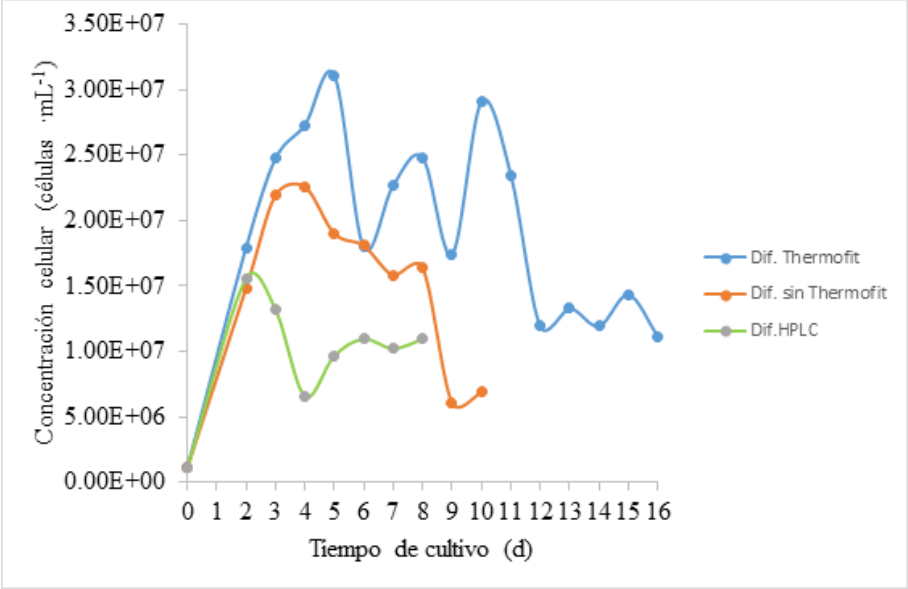


Figura 3.16.-Curvas de crecimiento utilizando tres configuraciones de difusores de aire.

El fotobiorreactor equipado con un difusor cubierto con cinta Thermofit, presentó una etapa de crecimiento exponencial de cuatro días, para dar inicio al quinto día a la etapa estacionaria en la que el cultivo alcanzó su máxima concentración celular, de 3.11 x 10^7 células·mL^{-1}, finalmente para el día doce el cultivo entro en fase de muerte celular. Por otra parte, la curva de crecimiento en la que se empleó un difusor de HPLC presentó una fase de crecimiento exponencial de dos días cuando alcanzó su máxima concentración celular, de 1.56x10^7 células·mL^{-1}, y luego mostró una fase de muerte celular. En esta serie de experimentos las curvas se realizaron solamente una vez. Aun así, se puede observar que hay una diferencia importante en la concentración celular alcanzada al final de la fase de crecimiento exponencial. También se observó que en este punto es cuando inició una sedimentación importante de biomasa dentro de los fotobiorreatores equipados con los difusores sin cinta Thermofit y del HPLC. Por ello, cuando se tomaba la muestra se tenía la precaución de tratar de suspender lo mejor posible la biomasa sedimentada. Con los resultados obtenidos en este experimento se tomó la decisión de emplear difusores de tipo piedra porosa con cubierta de cinta Thermofit, debido a que permitió una mejor aireación del medio, evitando una sedimentación prematura de las células.

3.4.2. Curva de crecimiento del fotobiorreactor con difusor con cinta Thermofit.

Habiendo decidido utilizar un difusor con cinta Thermofit, se realizó nuevamente la curva de crecimiento pero esta vez por triplicado (Figura 3.17). Se puede observar un día de la fase de adaptación, seguida de tres días de crecimiento exponencial que duró hasta el cuarto día de cultivo alcanzando una concentración celular máxima de 2.347 x 10^7 células·mL^{-1}, a partir de este tiempo inició la etapa de decaimiento o muerte celular.

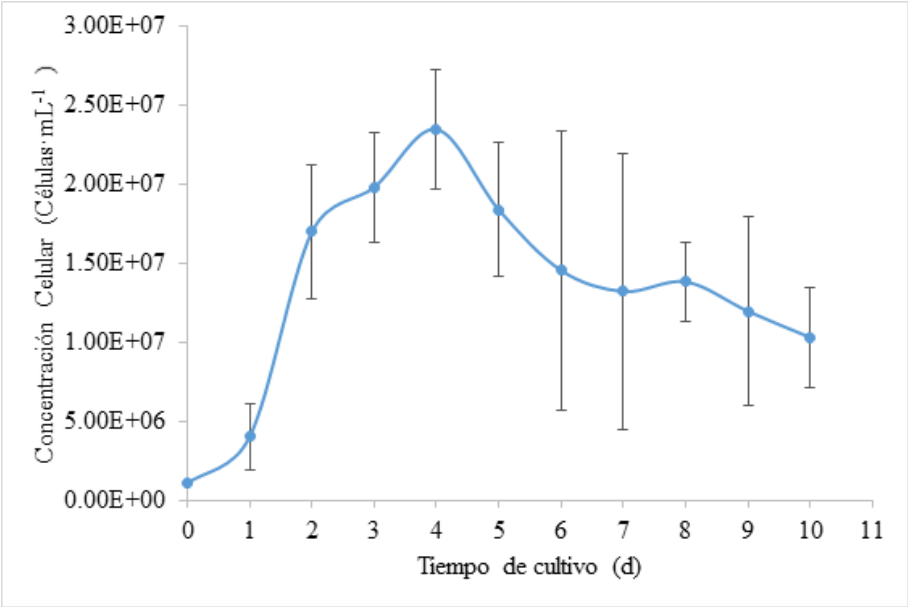


Figura 3.17. Curva de crecimiento en fotobiorreactor de 1L empleando un difusor de piedra porosa con cinta Thermofit.

Las curvas de crecimiento obtenidas en los fotobiorreactores presentaron el mismo tiempo para alcanzar el final de la fase de crecimiento exponencial que las obtenidas en matraces Celstir, con la diferencia de que la fase de decaimiento es más pronunciada en los primeros. Es por ello que la limitación de Nitrógeno se inició al día 4 en los fotobiorreactores y no al día 5 como en los Celstir. La concentración celular alcanzada en los fotobiorreactores (23.47×10^6 células·mL^{-1}) fue el doble de la obtenida en los matraces Celstir (10.87×10^6 células·mL^{-1}), esto puede deberse a la mayor cantidad de inóculo utilizada en el fotobiorreactor. Son necesarios otros experimentos para corroborar este efecto.

Se ha observado en fotobiorreactores de placa plana que frecuencias de mezclado de 0.033 hasta 0.25 Hz producen un aumento del 90% en la productividad de biomasa. En *Scenedesmus obliquus* se presentó un incremento en el crecimiento a una tasa de mezclado de 0.25 Hz, con una tasa de aireación de 1.340 vvm y una velocidad de flujo máximo de 20 cm·s^{-1} [124]. Especies como *Spirulina* sp y *Scenedesmus obliquus* cultivadas en fotobiorreactores tubulares verticales presentaron más del doble de producción de biomasa bajo agitación con CO_2 a una concentración del 6% que cuando fueron cultivadas en matraces bajo las mismas condiciones [125].

El aumento de la concentración celular en el fotobiorreactor tronco-cónico también puede deberse a la mejora en el mezclado del medio que conduce a mayores tasas de crecimiento y rendimiento fotosintético del cultivo, es decir, se reduce el efecto de sombreado en el cultivo. La disminución del tiempo de generación duplicando la tasa de reproducción celular, permite cultivos económicamente viables a escala industrial [126].

3.4.3.-Producción de biomasa.

Los resultados obtenidos con base en la producción de biomasa seca proveniente de los fotobiorreactores bajo un crecimiento rico en nutrientes se observa en la Figura 3.18.

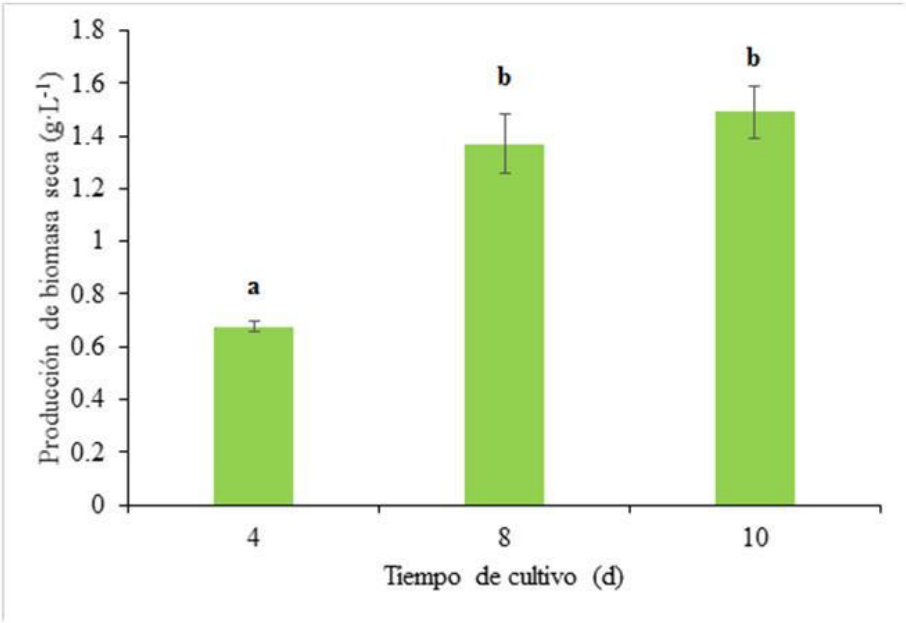


Figura 3.18.-Producción de biomasa seca de la microalga *Scenedesmus* sp. en fotobiorreactor de 1L bajo crecimiento rico en nutrientes. Letras diferentes representan diferencias significativas.

En la gráfica se puede observar la cantidad de biomasa seca obtenida al inicio de la etapa estacionaria, es decir, al cuarto día de cultivo, al octavo y décimo días en los que el cultivo se encontraba en etapa de muerte celular. Los valores obtenidos fueron de 0.6761, 1.3706 y 1.4904 $g \cdot L^{-1}$ a los días 4, 8 y 10 días de cultivo, respectivamente. El análisis estadístico determinó que existe una diferencia significativa entre el inicio de la etapa estacionaria y los días de muestreo posteriores.

El Nitrógeno juega un papel importante en el crecimiento de las microalgas y representa aproximadamente el 7-10 % del peso seco de las células, es un constituyente esencial de todas la proteínas estructurales y funcionales en las células algales [19]. Este nutriente promueve el crecimiento algal, mejorando la productividad de biomasa seca. Algunas microalgas como *Botryococcus braunii* presentan productividades máximas de biomasa cinco veces mayores empleando fuentes nitrogenadas de Sodio y Potasio que la obtenida empleando Nitrato de Amonio [127]. La cepa de *Scenedesmus* sp empleada para este estudio utilizó como fuente nitrogenada Cloruro de Amonio y presentó una productividad promedio de 148.64 $mg \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$.

La cepa *Scenedesmus* sp. fue sometida a limitación de Nitrógeno siguiendo el mismo procedimiento que en los matraces Celstir, sólo que la fase de crecimiento exponencial duró 4 días y la limitación se aplicó por 5 días más. Al final se recuperó la biomasa y los resultados se presentan en la Figura 3.19.

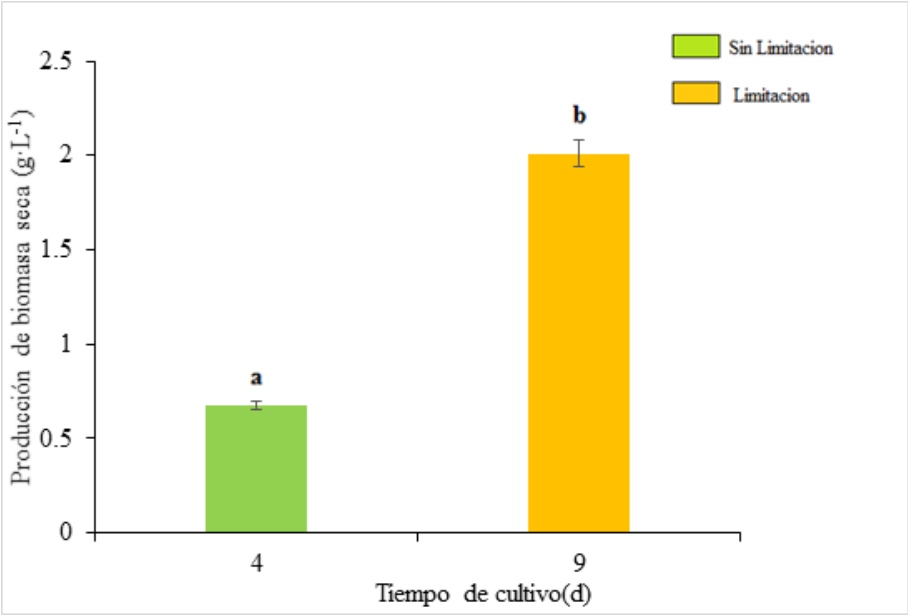


Figura 3.19.-Producción de biomasa seca de la microalga *Scenedesmus* sp. en fotobiorreactor de 1L bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas.

Los valores de biomasa seca obtenidos fueron de 0.6761 y 2.0084 $g \cdot L^{-1}$ al día 4 (sin limitación) y al día 9 de limitación de nitrógeno, respectivamente. El análisis estadístico

realizado presentó una diferencia significativa al día nueve de limitación, siendo en este tiempo donde se obtuvo una mayor cantidad de biomasa seca.

Por otra parte, el fotobiorreactor presentó una productividad de biomasa seca, Figura 3.20, de 146.15 $mg \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ al final del crecimiento exponencial (día 4 de cultivo), la cual aumentó a 266.24 $mg \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ después de 5 días bajo limitación de Nitrógeno.

Figura 3.20.- se quitó figura

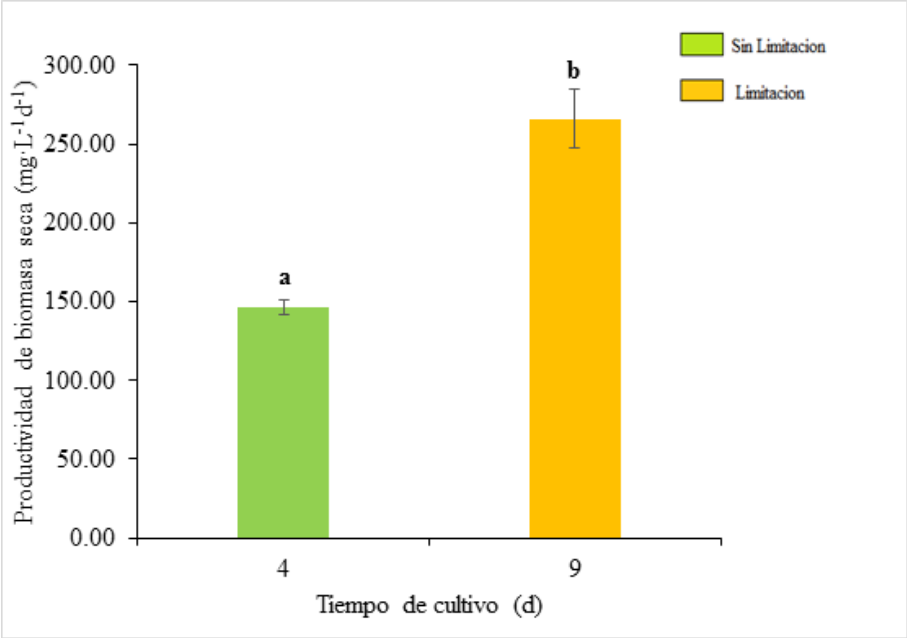


Figura 3.21.-Comparativa de la productividad de biomasa seca de la microalga *Scenedesmus* sp. en fotobiorreactor de 1L bajo limitación de nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas.

El Nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para las microalgas al ser uno de los componentes importantes de muchas macromoléculas biológicas como proteínas, clorofila, ADN, por lo que una limitación de Nitrógeno conduce a una disminución en la tasa de crecimiento, síntesis de proteínas, fotosíntesis, tamaño celular, así como a un aumento del contenido lipídico y de hidratos de carbono [19]. Se ha reportado que algunas especies como *Neochloris oleoabundans* presentan una disminución del 20 % en su tasa específica de crecimiento, mientras que por otro lado presentan un aumento en la acumulación de lípidos y carbohidratos. Bajo limitación de Nitrógeno y exceso de glucosa, pueden presentar un 44.6% de hidratos de carbono y 53.8% de lípidos [128]. La cepa *Scenedesmus*

sp. CCNM 1077 presentó una disminución del 44.77% de biomasa cuando se redujo de 247 a 0 mg·L^{-1} la concentración de Nitrógeno [129].

3.4.4.-Contenido lipídico.

La producción de lípidos aumentó de 228.82 mg·L^{-1} al final de la fase de crecimiento exponencial a 916.38 mg·L^{-1} después de la limitación de Nitrógeno (Figura 3.22).

Figura 3.22.-se quitó figura

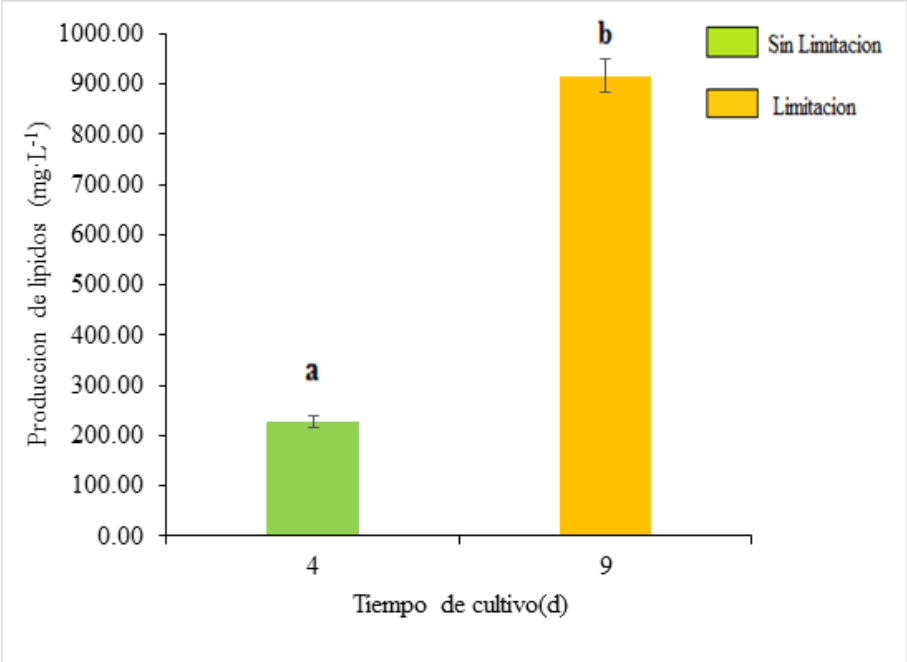


Figura 3.23.-Producción de lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. en fotobiorreactor de 1L bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas.

Se puede observar que el contenido lipídico es 4 veces mayor después de la limitación en comparación con el inicio de la misma.

La productividad de lípidos (Figura 3.23), fue de 49.45 mg·L^{-1}·d^{-1} al final de la fase de crecimiento exponencial y de 137.51 mg·L^{-1}·d^{-1} al final de la limitación de Nitrógeno.

Figura 3.24.-se quitó figura.

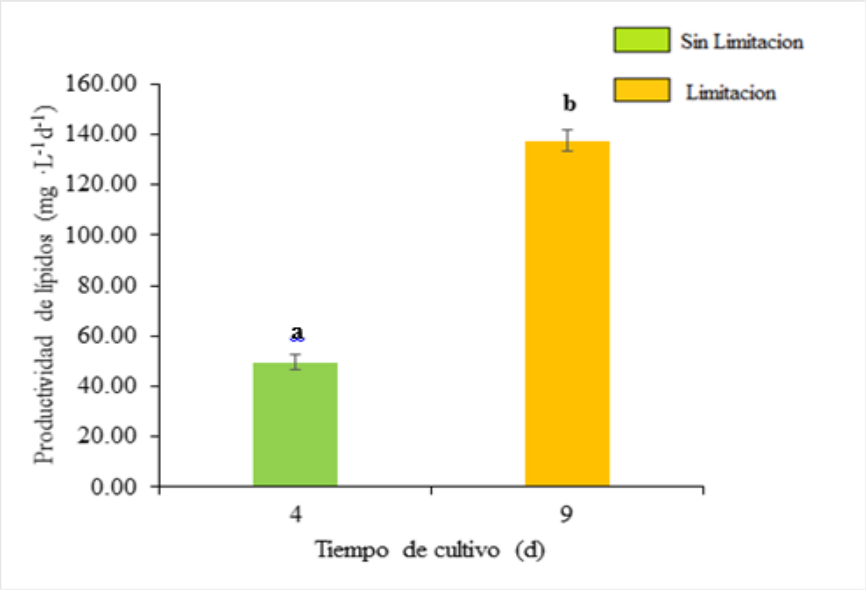


Figura 3.25. Productividad de lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. en fotobiorreactor de 1L bajo limitación de Nitrógeno. Letras diferentes representan diferencias significativas.

El contenido de lípidos se puede observar en la Figura 3.24, de igual manera que en los matraces Celstir, no hubo un efecto de la limitación de Nitrógeno en el porcentaje de lípidos de la biomasa microalgal, ya que se mantuvo en un promedio de 43 %.

Bajo limitación de Nitrógeno muchas especies de microalgas presentan una interrupción de la división celular, bajos niveles de proteína y clorofila mientras que aumenta el volumen celular, los lípidos, carotenoides y carbohidratos en respuesta a la inanición de este compuesto. *Chlamydomonas reinhardtii* presenta aumentos de lípidos neutros, TAG y carbohidratos bajo 4 días de limitación de Nitrógeno o Sulfuro [130].

Por otra parte, *Chlorella pyrenoidosa* presentó una ligera disminución de la concentración de biomasa debido a la falta de fuente de Nitrógeno ($NaNO_3$), pero un aumento en el contenido lipídico, con productividades máximas de 115 $mg \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ [131].

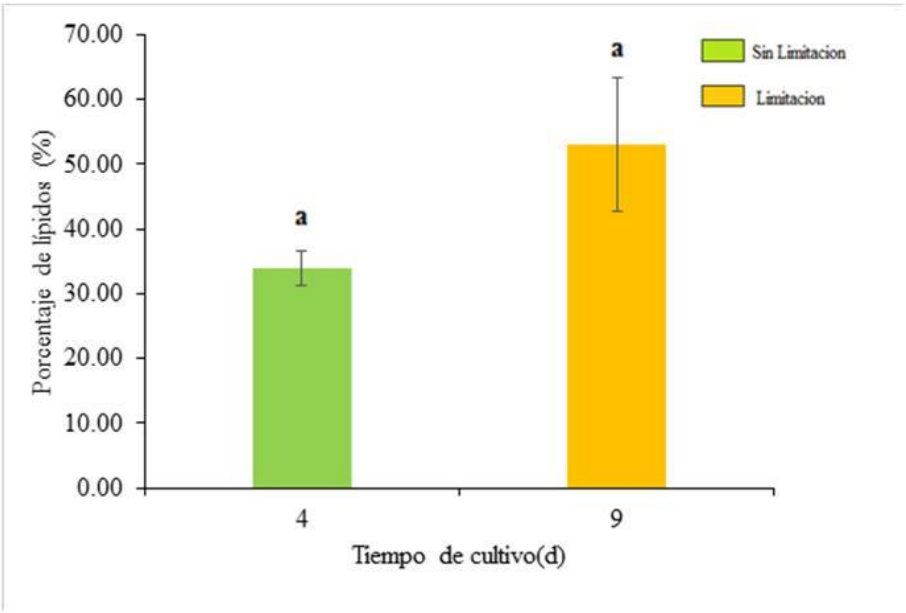


Figura 3.26. Contenido de lípidos de la microalga *Scenedesmus* sp. en medio TAP bajo limitación de Nitrógeno y crecimiento rico en nutrientes. Letras diferentes representan diferencias significativas.

La cepa *Scenedesmus obliquus* CNW-N, bajo limitación de Nitrógeno e intensidad luminosa de 420 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ y tiempo de limitación de 5 días, presentó una productividad de biomasa de 840 $mg \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$, una productividad lipídica de 140.35 $mg \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ y de carbohidratos de 383.35 $mg \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ [132]. Entre otros ejemplos, se encuentra la diatomea *Chaetoceros muelliri*, la cual presentó contenidos lipídicos de hasta 46.32% bajo limitación de Nitrógeno, las microalgas de la división de las *chlorophyceas* como *Dunaliella salina* y *Scenedesmus* sp LX1 mostraron bajo estrés de Nitrógeno porcentajes lipídicos de 54.15 y 30-43%, respectivamente [133, 134].

3.4.5.-Perfil lipídico.

Se determinó el perfil lipídico por medio de cromatografía de gases al inicio de la etapa estacionaria (4 días de cultivo) y después de la limitación de Nitrógeno, a los 9 días de cultivo.

En la tabla 3.3 se presenta la concentración de los ésteres de metilo presentes en las muestras en cada etapa del experimento.

Tabla 3.3.-Perfiles lipídicos (%) obtenidos en el fotobiorreactor tronco-cónico.

Ester metílico	Inicio de fase estacionaria (4 días)	Después de la limitación de Nitrógeno (9 días)
C14:0	37.82	3.04
C16:0	38.32	35.53
C18:0	2.4	42.5
C18:1	21.46	14.3
C18:2	0	4.63

Como se presenta en la tabla, al final de la etapa de crecimiento se observó la presencia de compuestos como C14, C16, C18:0, C18:1 y una ausencia de C18:2; sin embargo al ser sometida la microalga a limitación de Nitrógeno se pudo observar la aparición de éste en poca cantidad y un aumento considerable de C18:0. En principio, el mayor porcentaje de ésteres metílicos saturados no conviene para la producción de biodiesel con buenas características como combustible. Desde este punto de vista, las condiciones de cultivo en matraces Celstir son mejores ya que propiciaron un perfil de lípidos con mayor proporción de ésteres insaturados. La importancia de estudiar el perfil lipídico producido por las microalgas radica en el uso que se dará a los lípidos producidos. Por ejemplo, el biodiesel debe presentar un balance en el perfil lipídico, la presencia de compuestos como C16:0 y C18:0 le brindan un alto número de cetano para una mejor ignición y una estabilidad oxidativa, la presencia de compuestos como C18:1 y C18:2 le brindan un mejor flujo en frío para una mayor fluidez a bajas temperaturas [139].

Se ha reportado que las diferentes condiciones de nutrientes influyen significativamente en la composición de los ácidos grasos en las microalgas [133]. Especies como C. *muelleri*, bajo condiciones de estrés de Nitrógeno? presentan un contenido de ácido palmítico (C16:0) en porcentajes de 39-67 %, otro de los ácidos grasos presentes durante condiciones deficientes es el ácido linolénico (C18:3). Por otro lado *D. salina* bajo estrés presenta un contenido de 43-55% de C16:0, si esta especie es crecida en medio f/2 sin Fe tiende a producir abundantemente C18:3, y bajo medio f/2 sin N-P produce mayoritariamente ácido palmitoleico (C16:1) [133].

Algunas especies de microalgas como *Chlorella* sp MIC-G4 y MIC-G6 así como *Scenedesmus* sp, MIC-G8 las cuales crecen empleando $NaNO_3$ como fuente de Nitrógeno y posteriormente son sometidas a estrés de Nitrógeno, presentan mejoras en la acumulación lipídica. Los ácidos grasos más abundantes producidos por MIC-G4 son el C16:0 (19.5%), C18:2 (32.1%) y C18:3 (18.0%), mientras que MIC-G6 presentó porcentajes de estos compuestos de 27.3, 6.5 y 43.7% respectivamente. Finalmente, MIC-G8 presentó 22.3, 26.7 y 15.5 % de éstos compuestos, respectivamente [135].

Microalgas del género *Scenedesmus*, como *S. incrassatulus*, cultivadas bajo deficiencia de nutrientes presenta perfiles lipídicos de compuestos como C16:0, C18:1 y C18:3 con valores de 24.93, 45.36 y 5.97 % respectivamente [136]. Los ácidos grasos más abundantes presentes en *S. acutus* en condiciones ricas en nutrientes y bajo limitación de Nitrógeno fueron los ésteres de ácido (C16:0), (C18:0), (C18:1), (C18:2) y (C18:3) [137]. La cepa *Scenedesmus* sp. estudiada en el presente trabajo, mostró un perfil lipídico del 78.54 % de compuestos saturados (C14:0, C16:0 y C18:0) y un 21.46 % de compuestos monoinsaturados (C18:1) bajo crecimiento rico en nutrientes (4 días). Después de ser sometida a limitación de Nitrógeno por 5 días, el perfil presentó un 81.07 % de compuestos saturados (C14:0, C16:0 y C18:0) y 18.93% de insaturados (C18:1 y C18:2). Como podemos observar, las especies de *Scenedesmus* presentan perfiles muy variados, sugiriendo que el efecto de la limitación de Nitrógeno no sólo depende de los nutrientes limitantes sino también de la especie empleada [138] y como complemento aportado por el presente trabajo, las condiciones de cultivo.

3.5.-Construcción y montaje de la era de secado.

El área empleada por este sistema a escala laboratorio fue de 81 cm^2. Primeramente se empleó una cama de arena de 10 cm sobre una de grava de 20 cm (alturas mínimas según Swanwick [102]). Se extendió una capa de lodo microalgal de aproximadamente 0.1 cm sobre el sistema y el resultado preliminar de esta prueba fue un tiempo de secado aproximado de 10-11 días, por lo que se decidió disminuir la altura de la cama de arena para así poder reducir el tiempo de secado. Se probaron dos alturas de la cama de arena, 4

cm y 2 cm, dando como resultado tiempos de secado de 6 y 4 días respectivamente, con una humedad promedio de 7.82 % por lo que se decidió utilizar una altura de cama de arena de 2 cm (Figura 3.27).

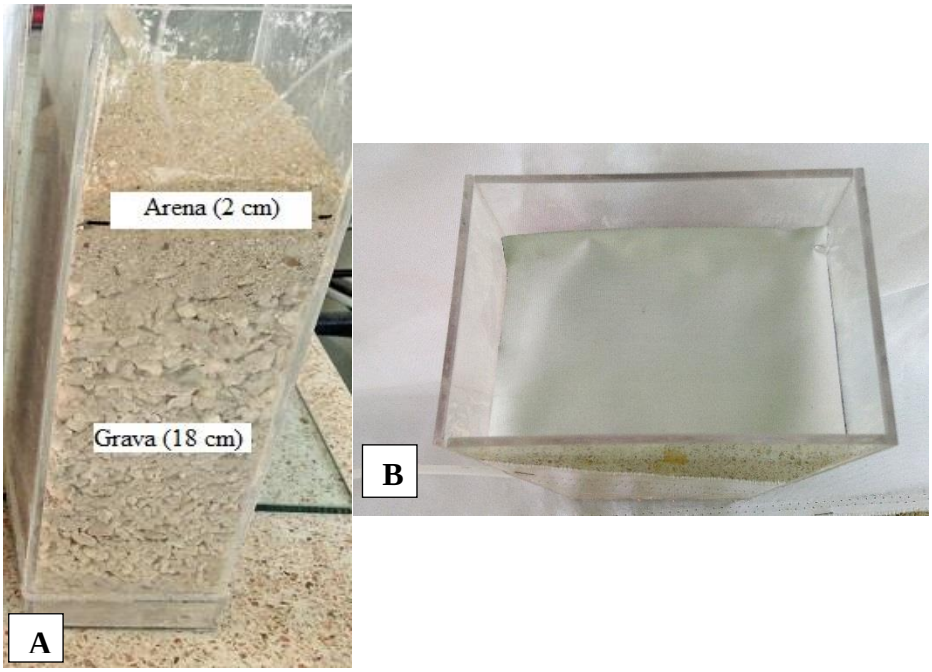


Figura 3.27.-A) Era de secado escala laboratorio; B) Vista superior del filtro de retención en la era de secado.

A nivel piloto se han empleado profundidades para secado de lodos algales de 4.5 a 5 in. los cuales presentaron tiempos de secado de 5 a 7 días, con un contenido final de humedad de 15 a 20 % [140].

3.5.1.-Eficiencia del equipo y filtro de retención (tela black out).

El equipo presentó una eficiencia promedio de secado de 92.18 ± 1.99 %, obteniendo como resultado un contenido de humedad de la biomasa microalgal de 7.82 ± 1.99 %, a temperaturas de 25 ± 2 °C (condiciones de laboratorio) Los resultados de las mediciones se encuentran en las tablas 3.4 y 3.5 del Anexo IV. Este método ha sido empleado en el secado de *Spirulina* en Sde Boker, Israel, presentando una humedad final de 10 % con tiempos de secado de 1 día. En la India bajo una temperatura ambiental de 60-65 °C, se presentan

tiempos de secado de 5-6 horas para la obtención final de un producto con una humedad de 4 al 8 % [96, 97].

La climatología de la región influye en la eficiencia de deshidratación del equipo y el tiempo de retención en el sistema. Para la región de Mérida, Yucatán se presentaron temperaturas máximas y mínimas promedio en los años 2012 y 2013, de 33. 97 y 34.58 respectivamente [141], las cuales mejorarían el tiempo de secado de 4 días que se obtuvieron bajo condiciones de laboratorio.

Empleando la era de secado como medio de deshidratación se obtuvo en promedio 1.25 ± 0.43 g de biomasa seca proveniente del cultivo en el fotobiorreactor. Por otro lado, utilizando una centrífuga como medio de concentración de biomasa, se obtuvo 6 ± 1.51 g de biomasa con un contenido hídrico en promedio de 79% (Tabla 3.6, Anexo IV), con este alto porcentaje de humedad es necesario un paso extra de secado, aumentando los costos del proceso.

Los costos de recolección de biomasa pueden reducirse de un 20-30% del costo total de producción a un 18-19% mediante el empleo de una era de secado. La utilización de un filtro de arena permite la absorción del contenido hídrico de la materia aumentando la zona de secado y por lo tanto la velocidad de evaporación [104].

Se determinó la eficiencia de la tela black out como filtro de retención midiendo el porcentaje de pérdida y recuperación de biomasa seca en el filtro. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.7 del Anexo V. Se obtuvo un porcentaje de eficiencia en la recuperación de biomasa con la tela black out de 86.85 ± 7.45 %.

Como se puede apreciar en la figura 3.28, la biomasa es fácilmente extraída de la tela y también es posible reutilizarla en el proceso de secado.

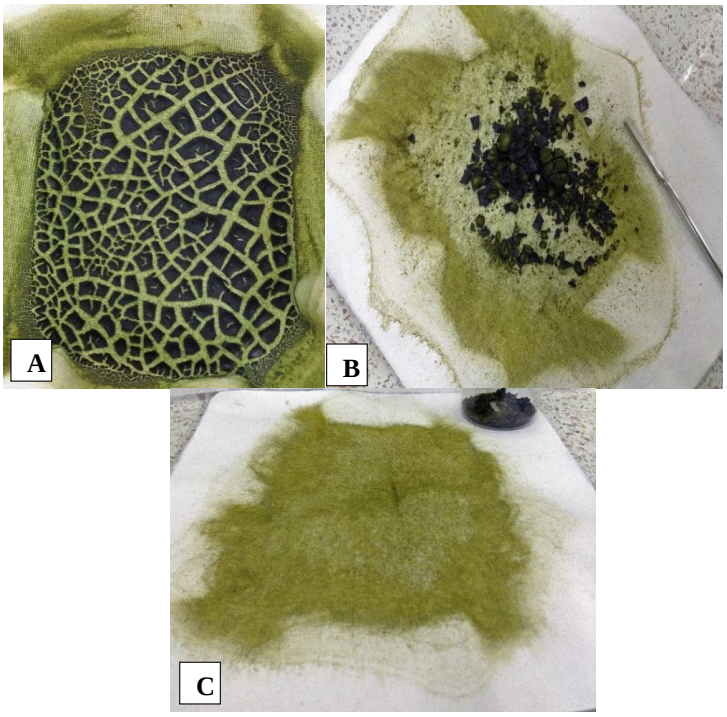


Figura 3.28 Filtro de retención de biomasa. A) Filtro con biomasa después del secado; B) Biomasa recuperada del filtro; C) Filtro al final de la recuperación de biomasa.

Las pérdidas de biomasa se pueden deber a células que lograron pasar el filtro y a las que quedan atrapadas en él, como se muestra en la figura 3.29.

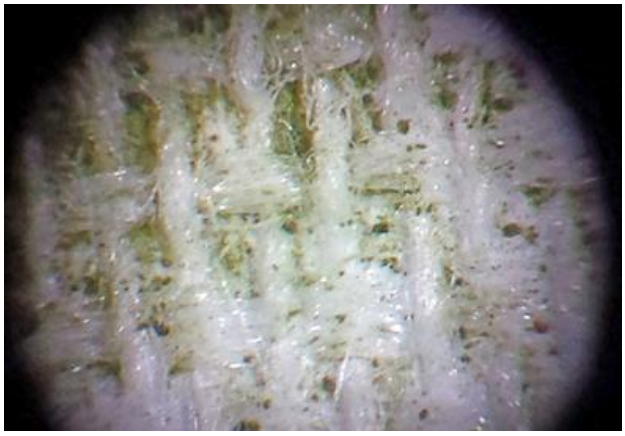


Figura 3.29.-Filtro de retención después de la cosecha.

El precio del material en el mercado textil es de $ 60.00 pesos el m^2, es más barata en comparación con los filtros de celulosa o de fibra de vidrio que se emplean a nivel laboratorio y que para escala industrial no serían económicamente viables.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El fotobiorreactor tronco-cónico como sistema de cultivo y cosecha para la microalga *Scenedesmus* sp. es factible a nivel laboratorio.

El tipo de difusor empleado en el fotobiorreactor tuvo un efecto importante en la agitación, la sedimentación de la biomasa y la estratificación de nutrientes.

Para evitar la proliferación de otros microorganismos, fue necesario el empleo de un inóculo mayor (10 % v/v) junto con una limpieza química con una solución de hipoclorito de sodio al 60 % (más concentrada que otros trabajos de la literatura).

Las condiciones de cultivo en el fotobiorreactor tronco-cónico propiciaron una mayor concentración celular, una mayor producción de biomasa y un mayor contenido lipídico en comparación con los matraces Celstir. Pero produjeron un efecto negativo en el perfil de lípidos ya que propiciaron la producción de una mayor cantidad de esteres de metilo saturados.

La utilización de tela black out como filtro de retención de la biomasa fue exitosa ya que demostró una eficiencia de recuperación del 86 %.

La era de secado como método de deshidratación tuvo una eficiencia de secado del 92 %, con un tiempo retención de 3-4 días, por lo que puede ser usada para recuperar y secar la biomasa microalgal.

Algunas perspectivas para mejorar el sistema de cultivo y deshidratación de biomasa son:

1. Disminuir la concentración de hipoclorito de sodio empleado en la limpieza química del reactor para reducir el daño al material del fotobiorreactor.
2. Utilizar en la fabricación del fotobiorreactor materiales resistentes y translucidos que permitan una mayor exposición luminosa.

3. Diseñar un mejor sistema de aireación/agitación para mejorar la hidrodinámica del fotobiorreactor.
4. Con respecto a la era de secado, es necesario realizar pruebas de secado de la biomasa al aire libre para determinar el tiempo de secado y el efecto de la humedad del ambiente fuera de un área controlada.
5. Encontrar las condiciones de trabajo en el fotobiorreactor que propicien una mayor producción de lípidos insaturados.

BIBLIOGRAFÍA.

[1] G. Knothe, «Historical Perspectives on Vegetable Oil-Based Diesel Fuels,» *Inform,* vol. 12, nº 1, pp. 103-1107, 2001.

[2] A. International, «ASTM Biodiesel Web Portal,» 1991-2014. [En línea]. Available: http://www.astmbiodieselfuel.com/pub/biodiesel/about.htm. [Último acceso: 27 octubre 2013].

[3] R. Altin, S. Cetinkaya y H. S. Yücesu, «The Potential of Using Vegetable Oil Fuels as Fuel for Diesel Engines,» *Energy Conversion & Management,* vol. 42, nº 5, pp. 529-538, 2001.

[4] L. Canoira, R. Alcántara y J. C. M. Jesús García-Martínez, «Biodiesel from Jojoba Oil-Wax: Transesterification with Methanol and Properties as a fuel.,» *Biomass & Bioenergy,* vol. 30, pp. 76-81, 2006.

[5] S. Puhan, N. Vedaraman y B. R. &. G. Nagarajan, «Mahua (Madhuca Indica) Seed Oil: a Source of Renewable Energy in India,» *Journal of Scientific & Industrial Research,* vol. 64, pp. 890-896, 2005.

[6] H. Sulistyo, S. S. Rahayu, G. Winoto y I. Suardjaja, «Biodiesel Production from High Iodine Number Candlenut Oil,» *International Journal of Chemical and Biological Engineering,* vol. 2, nº 2, pp. 62-65, 2009.

[7] X.Lang, A. Dalai, N. Bakhshi, M. J. Reaney y P. Hertz, «Preparation and Characterization of Bio-diesel from Various Bio-oils,» *Bioresource Technology,* vol. 80, pp. 53-62, 2001.

[8] M. J. Haas, «Improving the Economics of Biodiesel Production Through the Use of Low Value Lipids as Feedstocks: Vegetable Oil Soapstock,» *Fuel Processing Technology,* vol. 86, pp. 1087-1096, 2005.

[9] N. C. O. Tapanes, D. A. G. Aranda, J. W. d. M. Carneiro y O. A. C. Antunes, «Transesterificacion of Jatropha curcas Oil Glycerides: Theoretical and Experimental Studies of Biodiesel Reaction,» *Fuel,* vol. 87, pp. 2286-2295, 2008.

[10] V. Patil y K.-Q. T. &. H. R. Giselrod, «Towards Sustainable Production of Biofuels from Microalgae,» *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 9, pp. 1188-1195, 2008.

[11] F. M. Jr, «Biodiversity and Application of Microalgae,» *Journal of Industrial Microbiology,* vol. 17, pp. 477-489, 1996.

[12] J. Sheehan, T. Dunahay, J. Benemann y P. Roessler, «A Look Back at the U.S. Department of Energy´s Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae,» *National Renewable Energy Laboratory,* p. 328, 1998.

[13] Y. Li, M. Horsman, N. Wu, C. Q. Lan y N. Dubois-Calero, «Biofuels from Microalgae,» *Biotechnology,* vol. 24, pp. 815-820, 2008.

[14] Y. Chisti, «Biodiesel from Microalgae,» *Biotechnology Advances,* vol. 25, pp. 294-306, 2007.

[15] L. Rodolfi, G. C. Zittlelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi y M. R. T. Gimena Bonini, «Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor,» *Biotechnology & Bioengineering,* vol. 102, nº 1, pp. 100-112, 2009.

[16] C. M. M. Machado, «Situacion de los Combustibles de 2da y 3era Generación en America Latina y Caribe,» *Organizacion Latinoamericana de Energia (OLADE) y El Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura (IICA),* p. 104, 2010.

[17] G. S. &. C. Soeder, Algal Biomass: Production and Use, Amsterdam: Elsevier, 1980.

[18] Y. Chisti, Airlift Bioreactors, New York: Elsevier Applied Science, 1989.

[19] A. Richmond, Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology, Iowa State: Blackwell Science , 2004.

[20] Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz y M. S. &. A. Darzins, «Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuels Production: Perspectives and Advances,» *The Plant Journal,* vol. 54, pp. 621-639, 2008.

[21] O. Pulz, «Photobioreactors: Prodcution Systems for Phototrophic Microorganisms,» *Appl Microbiol Biotechnol,* vol. 57, pp. 287-293, 2001.

[22] P. Spolaore, C. Joannis-Cassan y E. D. &. A. Isambert, «Commercial Applications of Microalgae,» *Journal of Bioscience and Bioengineering,* vol. 101, nº 2, pp. 87-96, 2006.

[23] S. A. Khan, Rashmi, M. Z. Hussain, S. Prasad y U. Banerjee, «Prospects of Biodiesel Production from Microalgae in India,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews,* vol. 13, pp. 2361-2372, 2009.

[24] T. M. Mata y N. S. C. António A. Martins, «Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews,* vol. 14, pp. 217-232, 2010.

[25] H. M. Amaro, A. C. Guedes y F. X. Malcata, «Advances and Perspectives in using

microalgae to Produce biodiesel,» *Applied Energy*, vol. 88, pp. 3402-3410, 2011.

[26] A. Pandey, S. R. C. Larroche y C. D. &. E. Gnansounou, «Minor Edible oil crops,» de *Biofuels-Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, Biodiesel Science & Technology, 2011, pp. 159-187.

[27] M. K. Lam y K. T. Lee, «Microalgae Biofuels: A Critical Review of Issues, Problems and the Way Forward,» *Biotechnology Advances*, vol. 30, pp. 673-690, 2012.

[28] J. Singh y S. Gu, «Commercialization Potential of Microalgae for Biofuels Production,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, pp. 2596-2610, 2010.

[29] Z. Chen, Y. G. X. Fang y H. Hu, «Scenedesmus sp. NJ-1 Isolated from Antarctica: A Suitable Renewable Lipid Source for Biodiesel Production,» *World J. Microbiol Biotechnol*, vol. 28, pp. 3219-3225, 2012.

[30] J. Liu, C. Yuan, G. Hu y F. Li, «Effects of light Intensity on the Growth and Lipid Accumulation of Microalga Scenedesmus sp. 11-1 Under Nitrogen Limition,» *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 166, pp. 2127-2137, 2012.

[31] L. Xin, H. Hong-Ying y Z. Yu-Ping, «Growth and Lipid Accumulation Properties of a Freshwater Microalga Scenedesmus sp. Under Different Cultivation Temperature,» *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 3098-3102, 2011.

[32] S. Balasubramanian, J. D. Allen, A. Kanitkar y D. Boldor, «Oil Extraction from Scenedesmus obliquus Using a Continuos Microwave System-Design, Optimization and Quality Characterization,» *Bioresource Tecnology*, vol. 102, nº 3, pp. 3396-3403, 2011.

[33] G. Hodaifa, S. Sánchez, M. E. Martínez y R. Órpez, «Biomass Production of Scenedesmus obliquus from Mixtures of Urban and Olive-Oil Mill Wastewater USed as Culture Medium,» *Applied Energy*, vol. 104, pp. 345-352, 2013.

[34] A. Toledo-Cervantes, M. Morales, E. Novelo y S. Revah, «Carbon dioxide Fixation and Lipid Storage by Scenedesmus Obtusiusculus,» *Bioresource Technology*, vol. 130, pp. 652-658, 2013.

[35] c. R. Jácome-Pilco, E. Cristiani-Urbina, L. B. Flores-Cotera, R. Velasco-García, T. Ponce-Noyola y R. O. Cañizares-Vallanueva, «Continuous Cr(VI) Removal by Scenedesmus incrassatulus in an Airlift Photobioreactor,» *Bioresource Technology*, vol. 100, pp. 2388-2391, 2009.

[36] A. Pellon, F. Benítez, J. Frades, L. García y A. C. &. F. Alguacil, «Empleo de Microalgas Scenedesmus obliquus en la Eliminacion de Cromo Presente en Aguas

Residuales Galvanicas,» *Metalurgica,* vol. 39, pp. 9-16, 2003.

[37] M.D.Guiry, «Algabase,» 1996-2013. [En línea]. Available: http://www.algaebase.org/. [Último acceso: 2 Mayo 2013].

[38] G. Dragone, B. Fernandes y A. A. V. &. J. A. Teixeira, «Third Generation Biofuels from Microalgae,» *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology,* pp. 1355-1366, 2010.

[39] M. Olaizola, «Commercial Develoment of Microalgal Biotechnology: from the test Tube to the Marketplace,» *Biomolecular Engineering,* vol. 20, pp. 459-466, 2003.

[40] A. Darzins, P. Pienkos y L. Edye, Current Status and Potential for Algal Biofuels Production, canada: Energy Technology Network, 2010.

[41] M. A. Borowitzka, «Commercial Production of Microalgae: Ponds, Tanks and Fermenters,» *Progress in Industrial Microbiology,* vol. 35, pp. 313-321, 1999.

[42] B. Pushparaj, E. Pelosi, M. R. Tredici y E. P. &. R. Materassi, «An Integrated Culture System for Outdoor Production of Microalgae and Cyanobacteria,» *Journal of Applied Phycology,* vol. 9, pp. 113-119, 1997.

[43] Z. Su, R. Kang, S. Shi, W. Cong y Z. Cai, «An Economical Device for Carbon Supplement in Large-Scale Micro-Algae Production,» *Bioprcess Biosyst Eng,* vol. 31, pp. 641-645, 2008.

[44] D. Chiaramonti, M. Prussi, D. Casini, M. R. Tredici, L. Rodolfi, N. Bassi, G. C. Zittelli y P. Bondioli, «Review of Energy Balance in Raceway Ponds for Microalgae Cultivation: Re-Thinking a Traditional System is Possible,» *Applied Energy,* vol. 102, pp. 101-111, 2012.

[45] A. Darzins, P. Pienkos y L. Edye, Algae as a Feedstock for biofuels: An Assessment of the Current Status and Potential for Algal Biofuels Production, canada: Energy Technology Network, 2011.

[46] P. M. Schenk, S. R. Thomas-Hall, E. Stephens, U. C. Marx, J. H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse y B. Hankamer, «Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production,» *Bioenergy Research,* vol. 1, pp. 20-43, 2008.

[47] D. Chaumont, «Biotechnology of Algal Biomass Production: A Review of Systems for Outdoor Mass Culture,» *Journal of Applied Phycology,* vol. 5, pp. 593-604, 1993.

[48] A. P. Carvalho, L. A. Meireles y F. X. Malcata, «Microalgae Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances,» *Biotechnology Progress,* vol. 22, pp. 1490-1506, 2006.

[49] C. Ugwu, H. Aoyaagi y H. Uchiyama, «Photobioreactors for Mass Cultivationof Algae,» *Bioresource Technology,* vol. 99, pp. 4021-4028, 2008.

[50] E. Sierra, F. Acién, J. G. J.M. Fernández, C. Gnzalez y E. Molina, «Characterization of a Flat Plate Photobioreactor for the Production of Microalgae,» *Chemical engineering Journal,* vol. 138, pp. 136-147, 2008.

[51] E. Molina, J. Fernández, F. G. Acién y Y. Chisti, «Tubular Photobioreactor Design for Algal Cultures,» *Biotechnology,* vol. 92, pp. 113-131, 2001.

[52] F. A. Fernández, J. f. Sevilla, J. A. S. Pérez, E. M. Grima y Y. Chisti, «Airlift-Driven External-Loop tubular Photobioreactors for Outdoor Production of Microalgae: Assessment of Design and Performance,» *Chemical Engineering Science,* vol. 56, pp. 2721-2732, 2001.

[53] A. S. Mirón, A. C. Gómez, F. G. Camacho, E. Grima y Y. Chisti, «Comparative Evaluation of Compact Photobioreactors for Large-Scale Monoculture of Microalgae,» *Biotechnology,* vol. 70, pp. 249-270, 1999.

[54] O. P. &. K. Scheibenbogen, «Photobioreactors: Design and Performance with Respect to Light Energy Input,» *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology,* vol. 59, pp. 124-148, 1998.

[55] J. S. Burlew, Algal Culture From Laboratory to Pilot Plant, Washinton D.C: Carnegie Institution of Washington Publication, 1976.

[56] G. ChiniZittelli, F. Lavista, A. Bastianini, L. Rodolfi, M. Vincenzini y M. Tredici, «Production of Eicosapentaenoic Acid by Nannochloropsis sp. Cultures in Outdoor Tubular Photobioreactors,» *Biiotechnology,* vol. 70, pp. 299-312, 1999.

[57] A. Richmond, «The challenge Confronting Industrial Microagriculture: high Photosynthetic Efficiency in Large-Scale Reactors,» *Hydrobiologia,* vol. 151/152, pp. 117-121, 1987.

[58] M. R. Tredici y G. C. Zittelli, «Efficiency of Sunlight Utilization: Tubular Versus Flat Photobioreactors,» *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 57, nº 2, pp. 187-197, 1998.

[59] Q. Hu, H. Guterman y A. Richmond, «A Flat Inclined Modular Photobioreactor for Outdoor Mass Cultivation of Photoautotrophs,» *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 51, pp. 51-60, 1996.

[60] S. Hoekema, M. Binmans, M. Janssen, J. Tramper y R. H. Wijffels, «A pneumatically Agitated Flat-Panel Photobioreactor with Gas Re-circulation: Anaerobic Photoheterotrophic Cultivation of A Purple Non-Sulfur Bacterium,»

Hydrogen Energy, vol. 27, pp. 1331-1338, 2002.

[61] M. Janssen, J. Tramper y R. H. W. Luuc R. Mur, «Enclosed Outdoor Photobioreactors: Light Regime, Photosynthetic Efficiency, Scale-Up and Future Prospects,» *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 81, nº 2, pp. 193-210, 2003.

[62] T. M. Sobezuk, F. G. Camacho, E. M. Grima y Y. Chisti, «Effects of agitation on the Micrialgae Phaeodactylum Tricornutum and Porphyridium cruentum,» *Bioprocess Biosyst Eng,* vol. 28, pp. 243-250, 2006.

[63] G. C. Zittelli, L. Rodolfi, N. Biondi y M. R. Tredici, «Productivity and Photosynthetic Efficiency of Outdoor Cultures of Tetraselmis suecica in Annular Colums,» *Aquaculture,* vol. 261, nº 3, pp. 932-943, 2006.

[64] S. Krichnavaruk, S. Powtongsook y P. Pavasant, «Enhanced Productivity of Chaetoceros calcitrans in Airlift Photobioreactors,» *Bioresource Technology,* vol. 98, nº 11, pp. 2123-2130, 2007.

[65] A. S. Mir´n, M.-C. C. García, F. G. Camacho, E. M. Grima y Y. Chisti, «Growth and Biochemical Characterization of Microalgal Biomass Produced in Bubble Column and Airlift Photobioreactor Studies in Fed-Batch Culture,» *Enzyme and Microbial Technology,* vol. 31, pp. 1015-1023, 2002.

[66] Z. Xu, Z. Baicheng, Z. Yiping, C. Zhaaoling y C. W. &. O. Fan, «A Simple and Low-Cost Airlift Photobioreactor for Microalgal Mass Culture,» *Biotechnology Letters,* vol. 24, pp. 1767-1771, 2002.

[67] L. Brennan y P. Owende, «Biofuels from Microalgae- A Review Technologies for Production, Processing and Extractions of Biofuels and Co-productos,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews,* vol. 14, nº 2, pp. 557-577, 2010.

[68] U. d. Huelva, «Grupo de investigacion "bioquimica y biotecnologia de algas",» [En línea]. Available: http://www.uhu.es/index.php. [Último acceso: 25 Noviembre 2013].

[69] K. C. &. F.-J. Marquez-Rocha, «Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae,» *Biotechnology,* vol. 3, nº 1, pp. 21-34, 2004.

[70] R. A. Andersen, Algal Culturing Techniques, San Diego, California: Elsevier and Phycological Society of America, 2005.

[71] I. S. S. &. C.-G. Lee, «Photobioreactor Engineering: Design and Performance,» *Biotechnology and bioprocess Engineering,* vol. 8, pp. 313-321, 2003.

[72] M. S. A. Rahaman, L.-H. Cheng, X.-H. Xu, L. Zhang y H.-L. Chen, «A review of

Carbon Dioxide Capture and Utilization by Membrane Integrated Microalgal Cultivation Processes,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews,* vol. 15, pp. 4002-4012, 2011.

[73] E. Ono y J. L. Cuello, «Selection of Optimal Microalgae Species for CO2 Sequestration,» de *Second Annual Conference on Carbon Sequestration,* Virginia, USA, 2003.

[74] M. A. Borowitzka y J. M. H. &. A. OSborn, «Culture of th Astaxanthin-Producing green alga Haematococcus pluviales. 1.Effects of Nutruents on growth and Cell Type,» *Journal of Applied Phycology,* vol. 3, pp. 295-304, 1991.

[75] X. Gong y F. Chen, «Influence of Medium Components on Astaxanthin Content and Production of Haematococcus pluvialis,» *Process Biochemistry,* vol. 33, nº 4, pp. 385-391, 1998.

[76] M. R. K. y P. Bernhard, «Elemental Balancing of biomass and Medium Composition Enhaances growth Capacity in High-Density Chlorella Vulgaris Cultures,» *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 59, nº 5, pp. 605-611, 1998.

[77] T. H. Mehlitz, *Temperature Influence and HEat Management Requeriments of Microalgae Cultivation in Photobioeractors PhD Thesis,* San Luis Obispo: Facultad Politecnica de la Universidad del Estado de California , 2009.

[78] J. A. R. &. R. J. Geider, «Temperature and Algal Growth,» *New Phytol,* vol. 110, pp. 441-461, 1988.

[79] F. P. H. Martin, *Optimization of Photobioreactor for Astaxanthin Production in Chlorella Zofingiensis PhD Thesis,* Universidad Nacional de Singapur, 2010.

[80] J. R. C. &. B. Colman, «Inorganic Carbon Accumulation and Photosynthesis in a Blue-Green Alga as a Function of External pH,» *Plant Physiol,* vol. 67, pp. 917-921, 1981.

[81] A. S. Mirón, F. G. Camacho, A. C. Gómez y E. M. G. a. Y. Chisti, «Bubble-Column and Airlift Photobioreactors for Algal Culture,» *AIChE Journal,* vol. 46, nº 9, pp. 1872-1887, 2000.

[82] E. Suali y R. Sarbatly, «Conversion of microalgae to biofuel,» *Renewable and Sustainable Energy Review,* vol. 16, pp. 4316-4342, 2012.

[83] E. M. Grima, E.-H. Belarbi, F. A. Fernández, A. R. Medina y Y. Chisti, «Recovery of Microalgal Biomass and Metabolites Process Options and Ecnomics,» *Biotechnology Advances,* vol. 20, pp. 491-515, 2003.

[84] H. Grenwell, L. Laurens, R. Shields y R. W. L. &. K. Flynn, «Placing Microalgae on

the Biofuels Priority List: A Review of the Technologies Challenges,» *Journal of the Royal Society Interface,* vol. 7, pp. 703-726, 2010.

[85] N. Uduman, Y. Qi, M. K. Danquan y G. M. F. &. A. Hoadley, «Dewatering of Microalgal Cultures: A major Bottleneck to Algae-Based Fuels,» *Journal of Renewable and Sustainable Energy,* vol. 2, pp. 12701-12715, 2010.

[86] R. Harum, M. Singh, G. M. Forde y M. K. Danquah, «Bioprocess Engineering of Microalgae to Produce a Variety of Consumer Products,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews,* vol. 14, pp. 1037-1047, 2010.

[87] C. González-Fernández y M. Ballesteros, «Microalgae Autoflocculation: An Alternative to High-Energy Consuming Harvesting Methods,» *j. Appl. Phycol,* 2010.

[88] M. Y. Mollah, P. Morkovsky, J. A. Gomes, M. Kesmez, J. Parga y D. L. Cocke, «Fundamentals, Present and Future Perspectives of Electrocoagulation,» *Elseiver B.V,* 2004.

[89] P. Lertsutthiwong, S. Sutti y S. Powtongsook, «Optimization of Chitosan Flocculation for Phytoplankton Removal in Shrimp Culture Ponds,» *Aquacultural Engineering,* vol. 41, nº 3, pp. 188-193, 2009.

[90] M. G. McGarry, «Algal Flocculation with Aluminum Sulfate and Polyelectrolytes,» *Journal Water Pollution Control Federation,* vol. 42, nº 5, pp. 191-201, 1970.

[91] B. wang, Y. Li, N. Wu, C. Q y Lan, «CO2 Bio-mitigation Using Microalgae,» *Appl Microbiol Biotechnol,* vol. 79, pp. 707-718, 2008.

[92] T. Bruton, H. Lyons, T. Lerat, M. Stanley y M. B. Rasmussen, «A Review of the Potential of MArine Algae as a Source of Biofuel in Ireland,» *Sustainable Energy Ireland,* pp. 1-92, 2009.

[93] R. Muñoz y B. Guieysse, «Algal-Bacterial Processes for the Treatment of Hazardous Contaminants: A Review,» *Water Research,* vol. 40 , nº 15, pp. 2799-2815, 2006.

[94] M. Heasman, J. Diemar, W. O´connor y L. F. T. Sushames, «Development of Extended Shelf-life Microalgae Concentrate Diets Harvested by Centrifugation for Bivale Molluscs-A Summary,» *Aquaculture Research,* vol. 31, nº 8, pp. 637-659, 2000.

[95] B. Petrusevski y A. V. B. G. A. G. Bolier, «Tangential Flow Filtration: A Method to Concentrate freshwater algae,» *Water Research,* vol. 29, nº 5, pp. 1419-1424, 1995.

[96] D.-J. L. Kuan-Yeow Show y J.-S. Chang, «Algal Biomass Dehydration,» *Bioresource Technology,* vol. 135, pp. 720-729, 2013.

[97] G.Shelef, A. Sukenik y M.Green, Microalgae Harvesting and Processing: A Literature Review, Haifa, Israel: Technion Research and Development Foundation Ltd, 1984, pp. 1-71.

[98] C. Ryan, Cultivating Clean Energy: The Promise of Algae Biofuels, Washington D.c: Alice Hartley , Terrapin Bright Green, LLC, 2009.

[99] A. R. M. A. G. G. J. A. S. P. F. G. C. J. L. G. S. E. Molina Grima, «Comparison Between Extraccion of Lipids and Fatty Acids from Microalgal Biomass,» *Journal of the American Oil Chemists Society,* vol. 71, nº 9, pp. 955-959, 1994.

[100] I. Doymaz, «Sun drying of seedless and seeded grapes,» *J. Food Sci. Technol.,* vol. 49, nº 2, pp. 214-220, 2012.

[101] H. Hallak, J. Hillal, F. Hilal y R. Rahhal, «The Staircase Solar Dryer: Design and Characteristics,» *Renewable Energy,* vol. 7, nº 2, pp. 177-183, 1996.

[102] R. Ramalho, Tratamiento de Aguas Residuales, Barcelona, España: Reverte, 1996.

[103] S. ViajayaVenkataRaman, S. Iniyan y R. Goic, «A review of solar drying technologies,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews,* vol. 16, pp. 2652-2670, 2012.

[104] J. Brink y S. Marx, «Harvesting of Hartbeespoort Dam microalgal biomass through sand filtration and solar drying,» *Fuel,* vol. 106, pp. 67-71, 2013.

[105] P. Y. C. Pool, «Análisis del perfil de los ésteres metílicos obtenidos de dos microalgas verdes: Chalamydomonas reinhardtii y Chlorella Saccharophila, y su variacion en respuesta a condiciones de estres,» *Unidad de Energía Renovable, Centro de Investigacion Científica de Yucatán,* p. 127, 2010.

[106] V. A. Herrera-Valencia, P. Y. Contreras-Pool, S. Lopez-Adrian y L. F. Barahona-Pérez, «The Green Microalgae Chlorella saccharophila as a Suitable Source of Oil for Biodiesel Production,» *Curr. Microbiol.,* pp. 1-7, 2011.

[107] L. H. V. B. Moreno, *Norma Mexicana NMX-AA-016-1984,* México, D.F: Secretaria de Comercio y Fondo Industrial, 10 Diciembre de 1984.

[108] L. M. G. González, *Influencia de la deficiencia de nitrogeno y fosforo en las interacciones competitivas entre Chlorella vulgaris y Scenedesmus acutus,* Colombia: Universidad Nacional de colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biologia, 2010.

[109] Á. González-Garcinuño, A. Tabernero, E. M. M. d. V. Jose M. Sánchez-Álvarez y M. A. Galán, «Effect of nitrogen source on growth and lipid accumulation in Scenedesmus abundans and Chlorella ellipsoidea,» *Bioresource Technology,* vol.

173, pp. 334-341, 2014.

[110] I. A. Guschina y J. L. Harwood, «Algal lipids and effect of the enviroment on their biochemistry,» de *Lipids in Aquatic Ecosystems*, New York, Springer, 2009, pp. 1-24.

[111] N. E. Antonio, A. R. Marín, R. G. Z. Luis Jorge Pérez reda, Y. C. López, S. d. C. C. Garcia, M. Y. S. Pérez, J. G. C. Bretón, A. V. C. Quiroz y J. H. M. L., «Densidad celular y acumulación de lipidos en cultivos libres de Chlorella vulgaris y Neochloris oleoabundans a diferentes concentraciones de nitrogeno y carbonato de sodio,» *Unacar Tecnociencia,* vol. 5, nº 1, pp. 56-71, 2011.

[112] H. Tang, M. Chen, N. A. M.E.D Garcia y K. S. Ng, «Culture of microlagae Chlorella minutissima for biodiesel feedstock production,» *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 108, nº 10, p. 2280–2287, 2011.

[113] Y. Liang, N. Sarkany y Y. Cui, «Biomass and lipid productivities of Chlorella vulgaris under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions,» *Biotechnol Lett,* vol. 31, pp. 1043-1049, 2009.

[114] A. Illman y S. W. S. A. H. Scragg, «Increase in Chlorella Strains Calorific Values When Grown Nitrogen Medium,» *Enzyme and Microbial Technology,* vol. 27, pp. 631-635, 2000.

[115] S. Ruangsomboon, M. Ganmanee y S. Choochote, «Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, Scenedesmus dimorphus KMITL,» *J. Appl. Phycol,* vol. 25, pp. 867-874, 2013.

[116] M. J. Griffiths, R. P. V. Hille y S. T. L. Harrison, «Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions,» *J. Appl. Phycol,* vol. 24, pp. 989-1001, 2012.

[117] U. V. R. Andrés, *Efectos de la limitacion de nitrógeno y fosforo en la produccion de lípidos en el cultivo de las microalgas verdes Scenedesmus obliquus y Scenedesmus sp PhD Tesis,* vol. 102, Mérida, Yucatán: Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2011, pp. 10131-10135.

[118] A. Toledo-Cervantes, M. Morales y S. R. Eberto Novelo, «Carbon Dioxide Fixation and Lipid storage by Scendesmus Obtusiusculus,» *Bioresource Technology,* vol. 130, pp. 652-658, 2013.

[119] R. Huerlimann, R. d. Nys y K. Heimann, «Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production,» *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 107, nº 2, p. 245–257, 2010.

[120] A. Garibay-Hernández, R. Vazquez-Duhalt, L. Serrano-Carreón y A. Martinez, «Nitrogen limitation in Neochloris oleoabundans: A reassessment of its effect on cell growth and biochemical composition,» *Appl Biochem Biotechnol,* vol. 171, pp. 1775-1791, 2013.

[121] L. Tao, W. Linglin, L. Aifen y Z. chengwu, «Responses in growth, lipid accumulation and fatty acid composition of four oleginous microalgae to different nitrogen sources and concentrations,» *Chinese Journal of Oceanology and Limnology,* vol. 31, nº 6, pp. 1306-1314, 2013.

[122] Y. L. M. S. ,. Q. H. Liang Wanga, «A flexible culture process for production of the green microalga Scenedesmus,» *Bioresource Technology,* vol. 129, pp. 289-295, 2013.

[123] C. Y. G. H. F. L. Junhan Liu, «Effects of Light Intensity on the Growth and Lipid Accumulation of Microalga Scenedesmus sp. 11-1 Under Nitrogen Limition,» *Appl Biochem Biotechnol,* vol. 166, pp. 2127-2137, 2012.

[124] M. Leupold, S. Hindersin, M. Kerner y D. Hanelt, «The effect of discontinuous airlift mixing in outdoor flat panel photobioreactors on growth of Scenedesmus Obliquus,» *Bioprocess Biosyst. Eng.,* nº 36, pp. 1653-1663, 2013.

[125] M. G. d. Morais y J. A. V. Costa, «Carbon dioxide fixation by Chlorella kessleri, C. vulgaris, Scenedesmus obliquus and Spirulina sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors,» *Biotechnol Lett,* nº 29, pp. 1349-1352, 2007.

[126] A. Henrard, M. d. Morais y J. Costa, «Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of Cyanobium sp.,» *Bioresource Technology,* nº 102, pp. 4897-4900, 2011.

[127] P. Cheng, J. Wang y T. Liu, «Effects of nitrogen source and nitrogen supply model on the growth and hydrocarbon accumulation of immobilized biofilm cultivation of B. braunii,» *Bioresource Technology,* nº 166, pp. 527-533, 2014.

[128] D. Morales-Sánchez, R. Tinoco-Valencia, M. A. Caro-Bermúdez y A. Martinez, «Culturing Neochloris oleoabundans microalga in a nitrogen-limited heterotrophic fed-batch system to enhance lipid and carbohydrate accumulation,» *Algal Research,* nº 5, pp. 61-69, 2014.

[129] I. Pancha, K. Chokshi, B. George, T. Ghosh, C. Paliwal, R. Maurya y S. Mishra, «Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae Scenedesmus sp. CCNM 1077,» *Bioresource Technology,* nº 156, pp. 146-154, 2014.

[130] T. Cakmak, Y. E. D. Pinar Angun, A. D. Ozkan y T. T. Zeynep Elibol, «Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of Clamydomonas reinhardtii,» *Biotechnology and Bioengineering,* vol.

109, nº 8, pp. 1947-1957, 2012.

[131] F. Han, J. Huang, Y. Li, W. Wang, M. Wan, G. Shen y J. Wnag, «Enhanced lipid productivity of Chlorella pyrenoidosa through the culture strategy of semi-continuous cultivation with nitrogen limitation and pH control by CO2,» *Bioresource Technology,* nº 136, pp. 418-424, 2013.

[132] S.-H. Ho, c.-Y. Chen y J.-S. Chang, «Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO2 fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga Scenedesmus Obliquus CNW-N,» *Bioresource TEchnology,* nº 113, pp. 244-252, 2012.

[133] Y. Gao, M. Yang y C. Wang, «Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae,» *Bioresource Technology,* nº 147, pp. 484-491, 2013.

[134] S. Ruangsomboom, M. Ganmance y S. Choochote, «Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentration and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, Scenedesmus dimorphus KMITL,» *J. Appl Phycol,* nº 25, pp. 867-874, 2013.

[135] S. K. Ratha, R. Prasanna, R. B. Prasad, C. Sarika, D. W. Dhar y A. K. Saxena, «Modulating lipid accumulation and composition in microalgae by biphasic nitrogen supplementation,» *Aquaculture,* nº 392-395, pp. 69-76, 2013.

[136] M. T. Arias-Peñaranda, E. Cristiani-Urbina, C. Montes-Horcasitas, G. T. Fernando Esparza-García y R. O. Cañizares-Villanueva, «Scenedesmus Incrassatulus CLHe-Si01: A Potential source of renewable lipid for high quality biodiesel production,» *Bioresource Technology,* nº 140, pp. 158-164, 2013.

[137] M. C. Damiani, C. A. Popovich, D. Constenla, A. M. Martinez, E. Doria, P. Longoni, R. Cella, E. Nielsen y P. I. Leonardi, «Triacylglycerol Content, productivity and fatty acid profile in Scenedesmus Acutus PVUW12,» *J. Appl Phycool,* nº 26, pp. 1423-1430, 2014.

[138] H. Wu y X. Miao, «Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae Chlorella pyrenoidosa and Scenedesmus obliquus in response to nitrate levels,» *Bioresource Technology,* nº 170, pp. 421-427, 2014.

[139] F. Ganduglia, J. G. León, R. Gasparini, M. E. Rodriguez y J. E. E. F. Guillermo Jose Huarte, Manual de Biocombustibles, Montevideo, Urugay: Asociacion Regional de Empresas de Petróleo y Gas Natural de America Latina y el Caribe (ARPEL), octubre de 2009.

[140] C. Golueke y W. Oswald, «Harvesting and Processing Sewage-Grown Planktonic Algae,» *Journal (Water Pollution Control Federation),* vol. 37, nº 4, pp. 471-498,

1965.

[141] S. d. m. a. y. r. naturales, «Climatologia Mérida, Yucatán 2012-2013,» CONAGUA, Distrito Federal , 2012.

[142] Hutner, Methods in Enzymology, 23:86, 1950.

[143] D. G. &. R. Levine, «Cytochrome f and Plastocyanin: Their Sequence in The Photosynthetic Electron Transport Chain of Chlamydomonas reinhardii,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* vol. 54, nº 6, pp. 1665-1669, 1965.

[144] R. Sager y S. Granick, «Nutrional studies with Chlamydomonas reinhardii,» *Ann. N.Y Acad. Sci.,* vol. 56, pp. 831-838, 1953.

ANEXO I.

Tabla 1.6.-Floculantes utilizados para la cosecha de microalgas *[97]*.

Floculante	Tipo	Dosis óptima (mg/L)	pH óptimo	Prueba a escala
Alumbre	Ion metálico polivalente	80-250	5.3-5.6	Experimentos de flotación por lote y sedimentación. Experimentos a escala piloto
Sulfato férrico	Ion metálico polivalente	50-90	3.0-9.0	Unidades piloto de flotación y por lotes
Tratamiento con cal, induce precipitación con Mg (OH)	Hidróxido de metal cargado positivamente	500-700	10.5-11.5	Experimentos de sedimentación por lotes
Cationes poliméricos				
Purifloc	----------	35	3.5	Por lotes
Zetay 51	Polietileno Amina	10	>9	Por lotes
DOW 21M	Polietileno Amina	10	4-0.7	Por lotes
DOW C31	Polianima	1-5	2-4	Por lotes
Chitosan	Diacetilado polímerico de quitina		8.4	Por lotes

Tabla 1.7.-Comparación de cosechas por los métodos de flotación *[97]*.

Dispositivo.	Concentración final de lodo % TSS.	Energía relativa requerida.	Confiabilidad.	Recomendación para el tamaño de grupo de algas.	Observaciones.
Flotación por aire disuelto (DAF).	1-6	Alto	Muy buena	a+b	Requiere floculante.
Electroflotación.	3-5	Muy alta	Muy buena	a+b	Requiere floculante.
Flotación por aire disperso.	Desconocido	Desconocido	Baja	Desconocido	Reducción de pH o requerimiento de surfactante.

a.-Alga *Chlorella* **b**.-*Coelastrum, Micractinium.*

Tabla 1.8.-Comparación de la cosecha de microalgas por métodos de sedimentación por gravedad *[97]*.

Dispositivos.	**Concentración final de lodos % TSS.**	**Energía relativa requerida.**	**Confiabilidad**	**Recomendación para el tamaño del grupo de algas.**	**Observaciones.**
Tanque de clarificación.	0.5-3	Muy bajo.	Pobre.	a + b	Requiere floculante.
Tanque de sedimentación tipo Lamella.	1.5	Muy bajo.	Razonable.	a + b	Requiere floculante para diminutas algas.
Floculación en conjunción con un tanque de sedimentación.	1.5	Alto.	Bueno.	a + b	

a .-Alga *Chlorella.*
b.-*Coelastrum, Micractinium.*

Tabla 1.9.-Dispositivos de cosecha a través de filtros a presión *[97]*.

Dispositivo	**% TSS de la concentración**	**Energía consumida por m^3**	**Especie de alga**	**Observaciones**
Cámara de filtro a prensa	22-27%	0.88 kwh	*Coelastrum*	Método discontinuo, muy alta confiabilidad
Cinturón prensa	18 %	(15 ppm floc) 0.5 kwh	*Coelastrum*	Método continuo, necesaria un pre-concentración de floculantes, baja confiabilidad
Filtro de succión a presión	16 %		*Coelastrum*	Método discontinuo, buena confiabilidad
Tamiz cilíndrico (Presión causada por rotadores)	7.5 %	0.3 kwh	*Coelastrum*	Método continuo, buena confiabilidad
Canasta de filtración	5 %	0.2 kwh	*Coelastrum*	Método discontinuo, para pre-concentración, buena confiabilidad

Tabla 1.10.-Dispositivos de cosecha a través de filtros a vacío *[97]*.

Dispositivo	**% TSS de la concentración**	**Energía consumida por m^3**	**Especie de alga**	**Observaciones**
Tambor de filtro de vacío sin pre-revestimiento	18 %	5.9 kwh	*Coelastrum*	Método continuo, baja confiabilidad
Fécula de patata con capa preliminar de tambor de filtro de vacío	37 %	-	*Coelastrum* *Scenedesmus*	Método continuo
Filtro de succión (Vacío por una columna de agua de 2 m)	8 %	0.1 kwh	*Coelastrum*	Método discontinuo
Correa filtro	9.5 %	0.45 kwh	*Coelastrum*	Método continuo para pre-concentración; buena confiabilidad
Filtro espesante	5 -7 %	1.6 kwh	*Coelastrum* *Scenedesmus*	Método discontinuo, para pre-concentración, buena confiabilidad

ANEXO II.

Tris-acetato-fosfato (TAP) [142, 143, 144].

Solución stock	Cantidad	Concentración sol. stock
Tris-base 1M	20 ml L^{-1}	Tris-base 121.14 g L^{-1}
Buffer fosfatos	1 ml L^{-1}	K_2HPO_4 108 g L^{-1} KH_2PO_4 56 g L^{-1}
Metales traza Hunter*	1 ml L^{-1}	H_3BO_3 11.4 g L^{-1} $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 22 g L^{-1} $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 5.06 g L^{-1} $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 4.99 g L^{-1} $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.61 g L^{-1} $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.57 g L^{-1} $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 1.1 g L^{-1}
Solución TAP	10 ml L^{-1}	NH_4Cl 40 g L^{-1} $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 g L^{-1} $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 5 g L^{-1}
Ác. Acético glacial	1 ml L^{-1}	

Esterilizar a 120 °C (1.2 atm) durante 20 min, guardar a 4 °C. *Ver preparación abajo. Gorman, D.S. and R.P. Levine (1965). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54:1665-1669. Hutner, et al. (1950). Methods in Enzymology, 23:68. Sager, R. and S. Granick (1953). Ann. N.Y. Acad. Sci. 56:831-838.

Preparación de solución de metales traza Hunter para medio TAP.

1. Disolver 50g de EDTA en 250 mL de agua bidestilada. Aplicar temperatura para disolver.
2. Diluir, uno por uno y en el orden indicado los metales dados en la tabla de arriba, calentando a aproximadamente 100° en 550 mL de agua bidestilada.
3. Mezclar ambas soluciones (la solución resultante debe tener un color azul verdoso).
4. Calentar a 100°. Enfriar ligeramente, sin permitir que la temperatura baje de 80 – 90 °C.
5. Ajustar el pH de 6.5 a 6.8 con KOH al 20% (aprox. 83 mL). Mantener la temperatura por encima de los 70 °C hasta ajustar el pH.
6. Aforar a 1 L y dejar reposar en un matraz Erlenmeyer de 2 L tapado (usar un tapón y tapar con poca fuerza, de tal forma que el tapón quede ligeramente flojo). El color de la solución debe cambiar de color verde a púrpura.
7. Remover el precipitado color café rojizo por filtración con papel Whatman #1 con ayuda de un embudo Buchner. Repetir hasta que el papel filtro se observe limpio.
8. Guardar a 4 °C en un frasco ámbar.

ANEXO III

Diseño de la Era de secado.

Metodología para dimensionamiento de Era de Secado (Lechos de secado) [102].

Paso 1.- Se llenó una probeta de vidrio (25-30 mm de diámetro) con una base de arena con lodo a ensayar hasta un espesor de 200 a 300 mm.

Paso 2.- Se pretendió conseguir un drenado completo del líquido contenido en el lodo. Esto requerirá de 1-3 días dependiendo de las características del lodo y su humedad inicial.

Paso 3.- Una vez terminado el drenado, se removió la costra del lodo de la probeta. Se utilizó una parte de la muestra para conocer su humedad (secado en horno y pesado antes y después).

Paso 4.- Se colocó la costra de lodo en un platillo abierto que permitió la evaporación. Se comprobó la muestra periódicamente hasta que alcanzó el secado deseado (cuando la costra se puede levantar).

Determinación de humedad de la muestra para los pasos 2, 3 y 4:

Formula: % Humedad= $\frac{(M_1-M_2)}{M}$ X 100

- M1=Peso de crisol + Muestra Húmeda.
- M2=Peso del crisol + Muestra Seca.
- M=Peso de la muestra.

Inicial	
% Humedad	**% Sólidos**
99.44	0.56
99.32	0.67
99.34	0.66
Filtrada	
% Humedad	**% Sólidos**
24.08	76
8.3	91.7
11.24	88.76
Evaporada	

% Humedad	% Sólidos
7.05	92.95
5.06	94.94
3.01	96.99

Datos de diseño	
Densidad	1.9616 g/cm^3 (Obtenido por experimentación)
Espesor de lodo	0.1 cm
Área base de diseño	1 cm^2
Muestra	0.19165 g

Resultados obtenidos:
Materia Seca
5.9 x 10^{-3} g/cm^2
Materia Húmeda (Filtrada)
7.8 x 10^{-}3 g/cm^2
6.41 x 10^{-3} g/cm^2
6.62 x 10^{-3} g/cm^2
Materia Húmeda (Evaporada)
6.34 x 10^{-3} g/cm^2
6.21 x 10^{-3} g/cm^2
6.08 x 10^{-3} g/cm^2

Paso 5.- La diferencia entre los pesos del agua (humedad) al final del Paso 3 y 4 corresponde con el agua que hay que evaporar (fase de evaporación del mecanismo de secado). El agua a evaporar se expresó en mm evaporados.

H_20 a Evaporar	
1.46 x 10^{-3} g/cm^2	0.0146 mm
2 x 10^{-4} g/cm^2	0.002 mm
5.4 x 10^{-4} g/cm^2	0.0054 mm

Paso 6.- Se obtuvo datos meteorológicos de la zona para la lluvia (mm) y evaporación (mm), los cuales se tabularán por meses.

Paso 7.- Se preparó una tabla con los datos de precipitación multiplicados por 0.57 para cada mes. Basándonos en datos experimentales según los cuales el 43 % de la lluvia pasa a través de la torta quedando un 57 % a evaporar. Esta fracción varía, de hecho, con la intensidad de lluvias y variaciones. En zonas donde las lluvias son intensas y de corta duración, puede esperarse valores inferiores al 57 %. Se preparó en forma de tabla los datos de mm de evaporación multiplicados por 0.75 para cada mes. Basándonos en la evidencia de que la evaporación media del lodo húmedo es un 75 % la del agua libre.

Paso 8.- Se calculó la velocidad de evaporación media (mm/d) para cada mes.

Paso 9.- En base a los valores del paso 8, se determinó el tiempo requerido para evaporar los mm de agua calculados en el paso 5 para cada mes.

Paso 10.- En base a los valores calculados en el paso 8 y los mm calculados de lluvia multiplicados por 0.57, se calculó el tiempo requerido para evaporar el agua de lluvia (días).

Paso 11.- Se obtuvo para cada mes el tiempo total para la evaporación del agua, es decir, la del lodo, calculado en el paso 9, más la de lluvia, calculado en el paso 10.

Paso 12.- Se tomó el tiempo más largo de los obtenidos en el paso 11 como dato de diseño.

Se calculó los m^2 de lecho requerido

Áreas resultantes:
23.61 cm^2
172.41 cm^2
63.85 cm^2
Promedio: 86.62 cm^2

Datos de diseño con climatología del 2012.

							Muestra 1			Muestra 2		Muestra 3	
Mes	Precip. (mm)	Evap. (mm)	(Precip.) x (0.57)	(Evap.) x (0.75)	Días por Mes	Evap. media	Tiempo requerido para evaporar 0.0146 mm	Tiempo para evaporar la precip.	Días totales	Tiempo requerido para evap. 0.002 mm	Días totales	Tiempo requerido para evap. 0.0054 mm	Días totales
Enero	59.6	128.31	33.97	96.23	31	0.3221	0.004703	10.9436	10.9483	0.0006443	10.9443	0.0017395	10.9454
Febrero	4.9	137.69	2.79	103.27	28	0.2711	0.003959	0.7573	0.7613	0.0005423	0.7578	0.0014642	0.7588
Marzo	2	237.99	1.14	178.49	31	0.1737	0.002536	0.1980	0.2005	0.0003474	0.1983	0.0009379	0.1989
Abril	112.4	218.05	64.07	163.54	30	0.1834	0.002678	11.7529	11.7556	0.0003669	11.7533	0.0009906	11.7539
Mayo	52	262.89	29.64	197.17	31	0.1572	0.002296	4.6602	4.6625	0.0003145	4.6605	0.0008490	4.6610
Junio	186.9	161.76	106.53	121.32	30	0.2473	0.003610	26.3435	26.3471	0.0004946	26.3440	0.0013353	26.3448
Julio	99.8	184.09	56.89	138.07	31	0.2245	0.003278	12.7725	12.7758	0.0004491	12.7729	0.0012125	12.7737
Agosto	135.1	198.67	77.01	149.00	31	0.2081	0.003038	16.0213	16.0244	0.0004161	16.0217	0.0011235	16.0224
Septiembre	235	180.79	133.95	135.59	30	0.2213	0.003230	29.6366	29.6398	0.0004425	29.6370	0.0011948	29.6378
Octubre	138.2	147.52	78.77	110.64	31	0.2802	0.004091	22.0715	22.0756	0.0005604	22.0721	0.0015130	22.0730
Noviembre	16.4	132.43	9.35	99.32	30	0.3020	0.004410	2.8235	2.8279	0.0006041	2.8241	0.0016311	2.8252
Diciembre	13.9	148.06	7.92	111.05	31	0.2792	0.004076	2.2118	2.2159	0.0005583	2.2124	0.0015075	2.2133

Datos de diseño con climatología del 2013.

							Muestra 1			Muestra 2		Muestra 3	
Mes	Precip. (mm)	Evap. (mm)	(Precip.) x (0.57)	(Evap.) x (0.75)	Días por Mes	Evap. media	Tiempo requerido para evap.0.0146 mm	Tiempo para evap. la precip.	Días totales	Tiempo requerido para evap.0.002 mm	Días totales	Tiempo requerido para evap.0.0054 mm	Días totales
Enero	46.6	143.3	26.562	107.48	31	0.2884	0.004211	7.6615	7.6657	0.0005769	7.6621	0.001558	7.6631
Febrero	1.4	168.97	0.798	126.73	28	0.2209	0.003226	0.1763	0.1795	0.0004419	0.1768	0.001193	0.1775
Marzo	27.3	232.46	15.561	174.35	31	0.1778	0.002596	2.7669	2.7695	0.0003556	2.7672	0.000960	2.7678
Abril	63	294.03	35.91	220.52	30	0.1360	0.001986	4.8852	4.8872	0.0002721	4.8855	0.000735	4.8860
Mayo	113.4	279.49	64.638	209.62	31	0.1479	0.002159	9.5592	9.5614	0.0002958	9.5595	0.000799	9.5600
Junio	186.4	204.75	106.248	153.56	30	0.1954	0.002852	20.7566	20.7595	0.0003907	20.7570	0.001055	20.7577
Julio	156.4	204.75	89.148	153.56	31	0.2019	0.002947	17.9965	17.9995	0.0004037	17.9969	0.001090	17.9976
Agosto	189.3	181.54	107.901	136.16	31	0.2277	0.003324	24.5671	24.5704	0.0004554	24.5675	0.001229	24.5683
Septiembre	207.7	172.4	118.389	129.30	30	0.2320	0.003387	27.4684	27.4718	0.0004640	27.4689	0.001253	27.4697
Octubre	157.7	130.76	89.889	98.07	31	0.3161	0.004615	28.4140	28.4186	0.0006322	28.4146	0.001707	28.4157
Noviembre	59.7	10076	34.029	7557.00	30	0.0040	0.000058	0.1351	0.1351	0.0000079	0.1351	0.000021	0.1351
Diciembre	60.2	104.79	34.314	78.59	31	0.3944	0.005759	13.5348	13.5406	0.0007889	13.5356	0.002130	13.5369

Tiempo de diseño promedio 29.0265 Días

ANEXO IV.

Contenido de Humedad.

Tabla 3.4.-Humedad inicial de la biomasa microalgal.

Porcentaje de humedad al inicio del secado	
Humedad (%)	**Solidos (%)**
99.44	0.56
99.37	0.63
99.34	0.66
99.25	0.75
99.51	0.49
99.47	0.53

**Se tomó una muestra representativa de 10 mL. *Con 6 repeticiones.*

Tabla 3.5.-Humedad final de la biomasa microalgal.

Porcentaje de humedad al final del secado	
Humedad (%)	**Solidos (%)**
7.08	92.92
8.3	91.7
5.13	94.87
9.78	90.22
6.39	93.61
10.25	89.75

**Se tomó una muestra representativa de 10 mL. *Con 6 repeticiones.*

Tabla 3.6.-Comparación de secado.

Biomasa seca (g) Era de secado	**Biomasa húmeda (g) Centrifuga**	**H_20 retirada (g)**	**Eficiencia del secado (g H_2O / g de biomasa húmeda)**
1.4268	6.2703	4.84	0.7725
1.3215	7.5379	6.22	0.8247
1.6262	6.5255	4.90	0.7508
0.6626	3.5417	2.88	0.8129
0.6896	3.6121	2.92	0.8091
1.5011	6.5809	5.08	0.7719
1.3693	7.5405	6.17	0.8184
1.2106	7.1567	5.95	0.8308
0.5391	3.4517	2.91	0.8438
1.4598	7.4505	5.99	0.8041
0.3608	3.005	2.64	0.8799
0.8026	4.8505	4.05	0.8345
0.9496	4.989	4.04	0.8097
1.5438	6.4905	4.95	0.7621
0.8905	4.9205	4.03	0.8190
1.372	7.2258	5.85	0.8101
1.7249	7.8	6.08	0.7789
0.994	4.716	3.72	0.7892
1.4782	7.4277	5.96	0.8013
1.4216	6.0681	4.64	0.7653
0.935	4.7321	3.80	0.8024
2.0588	7.2726	5.21	0.7169
1.5593	6.5165	4.96	0.7607
1.4518	6.5909	5.14	0.7797
1.958	7.7273	5.77	0.7466
Promedio= 1.2523	Promedio= 6.0	Promedio= 4.748	Promedio= 0.7958
Desviación= 0.434	Desviación= 1.515	Desviación= 1.143	Desviación= 0.035

ANEXO V.

Eficiencia del filtro de retención.

Tabla 3.7.-Eficiencia de filtro.

Biomasa Total (g)	Peso inicial de la tela (g)	Peso final de la tela (g)	Residuo (g)	% Perdida
1.59	10.089	10.2501	0.1611	10.15
1.43	10.0908	10.198	0.1072	7.50
1.74	10.153	10.2646	0.1116	6.42
0.80	10.0635	10.2018	0.1383	17.27
0.87	9.9575	10.1365	0.179	20.61
1.70	10.2496	10.4506	0.201	11.81
1.57	10.289	10.4903	0.213	12.82
1.31	9.5678	9.7611	0.1033	7.86
0.642	9.5679	9.6704	0.1025	15.98
1.571	9.4505	9.562	0.1115	7.10
0.524	9.5679	9.7312	0.1633	31.16
0.929	10.0234	10.1501	0.1267	13.63
1.073	10.1567	10.2801	0.1234	11.50
1.638	9.2509	9.345	0.0941	5.75
1.110	9.2386	9.458	0.2194	19.77
1.617	8.9451	9.1898	0.2447	15.14
1.84	10.609	10.7243	0.1153	6.27
1.11	10.6503	10.7705	0.1202	10.79
1.79	10.6605	10.9745	0.314	17.52
1.51	9.5825	9.6732	0.0907	6.00
1.41	10.9075	11.3826	0.4751	33.69
2.22	10.8539	11.0106	0.1567	7.07
1.65	10.1594	10.2496	0.0902	5.47
1.76	9.7693	10.0753	0.306	17.41
2.18	9.6097	9.8304	0.2207	10.13
			Promedio	13.15 %