



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL

**“LÍNEA BASE PARA EL APROVECHAMIENTO DE MICROALGAS DE  
SISTEMAS DE TRATAMIENTO  
DE AGUA RESIDUAL”**

Tesis previa a la obtención del  
Título de Ingeniero Civil

**Autoras:**

María Alexandra Cabrera Cabrera  
María Fernanda Pulla Tenemaza

**Director:**

Ing. Andrés Omar Alvarado Martínez, PhD.

**CUENCA – ECUADOR  
Septiembre - 2014**



## Resumen

En las últimas décadas el rápido agotamiento de las reservas de combustibles fósiles ha impulsado a investigar y desarrollar nuevas tecnologías energéticas amigables con el ambiente. Actualmente, la investigación acerca de biocombustibles producido mediante la transesterificación de lípidos extraídos de microalgas, con una huella de carbono neutral, ha demostrado un gran potencial. En esta investigación se implementó cultivos de microalgas con cinco diferentes familias: *Chlorella*, *Scenedesmus*, y tres familias aisladas pero no identificadas. Se realizó análisis de crecimiento con la familia *Chlorella*. Las tasas de crecimiento que se obtuvieron para esta familia mediante recuento celular fueron  $0.022 \text{ h}^{-1}$  en fase exponencial. Se implementó un respirómetro a escala laboratorio para medir la tasa de consumo biológico de oxígeno bajo condiciones conocidas. Además se realizaron protocolos de experimentación para la obtención de lípidos con la finalidad de producir biocombustible con diferentes solventes como Metanol, Cloroformo, Hexano, Etanol y Acetona, obteniendo que el contenido de lípidos más clorofila de las familias experimentadas varían de 5.2 a 23.7% de su peso seco, según el solvente utilizado. Se estudió también la efectividad de la remoción de nutrientes de las microalgas, verificando la gran capacidad de estas para incorporar en su composición celular nitrógeno y fósforo durante su acelerado crecimiento; por lo que su cultivo en aguas residuales domésticas, normalmente ricas en nutrientes, además de cumplir una función depuradora, constituye una práctica altamente viable y energéticamente sustentable.

*Palabras clave:* Tratamiento de aguas residuales, lagunas de estabilización, lagunas de algas de alta tasa, microalgas, respirómetro, lípidos, biocombustible, biotecnología.



## Abstract

The rapid reduction of fossil fuel reserves has encouraged the research and development of new energy technologies with lower impact to the environment during the last decades. Today, the research on biofuel produced through transesterification of microalgae lipids extracted with a neutral carbon footprint, has shown a vast potential. In this research, five different families of microalgae were cultured: Chlorella, Scenedesmus, and three isolated but unidentified families. Growth rates determination was performed using the chlorella family by cell count techniques. The growth rate obtained was  $0.022 \text{ h}^{-1}$  during the exponential phase of growing. A respirometer technique at laboratory scale was implemented to investigate the rate of biomass oxygen consumption under controlled conditions. Besides, experimental protocols for the production of lipids with the purpose of producing biofuels was tested. Different solvents such as methanol, chloroform, hexane, ethanol and acetone were used, obtaining lipid and chlorophyll mixed content in the algae cells from 5.2 to 23.7% of the dry cell weight, depending on the solvent used. The nutrient removal efficiency of microalgae was also assessed, verifying the high capacity of microalgae to incorporate into their cell composition nitrogen and phosphorus during the exponential cell growth. The latest, confirms the high potential of microalgae cultures in nutrient rich environments like the domestic wastewater, helping on the removal of organic matter and also bringing a sustainable practice by means of the energy recovery from their cell composition.

*Keywords:* Wastewater treatment, waste stabilisation ponds, high rate algal ponds, microalgae, respirometer, lipids, biofuels, biotechnology.



## Contenido

|  |    |
|--|----|
| Resumen .....  | 2  |
| Abstract .....   | 3  |
| Agradecimiento .....   | 16 |
| Dedicatoria .....  | 17 |
| CAPÍTULO 1 .....   | 18 |
| 1 Introducción .....   | 18 |
| 1.1 Antecedentes .....   | 18 |
| 1.2 Justificación.....   | 19 |
| 1.3 Objetivos .....  | 19 |
| 1.3.1 Objetivo general.....  | 19 |
| 1.3.2 Objetivos específicos.....                                   | 19 |
| 1.4 Descripción General.....                                       | 20 |
| CAPÍTULO 2 .....   | 21 |
| 2 Revisión de Literatura .....                                     | 21 |
| 2.1 Introducción.....  | 21 |
| 2.2 Tratamiento de Agua Residual.....                              | 22 |
| 2.3 Sistemas Lagunares.....  | 23 |
| 2.3.1 Introducción .....   | 23 |
| 2.3.2 Lagunas de estabilización (WSP) .....                        | 24 |
| 2.3.3 Lagunas de Algas de Alta Tasa (HRAP).....                    | 28 |
| 2.4 Microalgas presentes en sistemas lagunares de tratamiento..... | 31 |
| 2.4.1 Introducción .....   | 31 |
| 2.4.2 Biología de las algas.....                                   | 31 |
| 2.4.3 Procesos de algas en sistemas lagunares .....                | 32 |
| 2.4.4 Diversidad de las algas.....                                 | 33 |
| 2.5 Crecimiento de microalgas.....                                 | 34 |
| 2.5.1 Tasa de crecimiento .....                                    | 36 |
| 2.5.2 Tiempo de duplicación y tasa específica de crecimiento ..... | 36 |
| 2.5.3 Parámetros que influyen en el crecimiento de las algas.....  | 38 |



|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| 2.6             | Ensayo de Respirometría.....  | 41 |
| 2.6.1           | Introducción.....   | 41 |
| 2.6.2           | Clasificación.....  | 41 |
| 2.7             | Microalgas como fuente de biocombustible.....   | 42 |
| 2.7.1           | Introducción.....   | 42 |
| 2.7.2           | Productividad de microalgas.....  | 43 |
| 2.7.3           | Extracción de lípidos.....  | 45 |
| 2.7.4           | Factores que afectan la calidad de los lípidos de microalgas....                                    | 45 |
| CAPÍTULO 3..... |   | 47 |
| 3               | Materiales y Métodos.....   | 47 |
| 3.1             | Introducción.....   | 47 |
| 3.2             | Diseño experimental para el cultivo y crecimiento de microalgas.....                                | 47 |
| 3.2.1           | Materiales y procedimientos usados para la producción de microalgas<br>48                           |    |
| 3.2.2           | Materiales y procedimientos usados para la evaluación de la tasa de<br>crecimiento.....             | 52 |
| 3.2.3           | Materiales y procedimientos para la obtención de biomasa algal                                      | 58 |
| 3.3             | Configuración de un respirómetro a escala laboratorio.....  | 63 |
| 3.3.1           | Automatización del Respirómetro.....  | 65 |
| 3.4             | Metodología y protocolos de experimentación con microalgas.....                                     | 68 |
| 3.4.1           | Materiales y procedimientos usados para la extracción de lípidos<br>mediante el método Soxhlet..... | 69 |
| CAPÍTULO 4..... |   | 74 |
| 4               | Resultados y discusión.....   | 74 |
| 4.1             | Introducción.....   | 74 |
| 4.2             | Caracterización de las especies de microalgas estudiadas.....                                       | 74 |
| 4.3             | Condiciones para el crecimiento de microalgas.....  | 76 |
| 4.4             | Obtención de parámetros biocinéticos de microalgas.....   | 77 |
| 4.5             | Análisis de remoción de nutrientes.....   | 81 |
| 4.6             | Análisis de solidos suspendidos volátiles.....  | 82 |
| 4.7             | Implementación de un respirómetro a escala laboratorio.....   | 83 |
| 4.7.1           | Protocolo de experimentación para respirometría.....  | 83 |



|                  |  |     |
|------------------|--|-----|
| 4.7.2            | Resultados de la experimentación respirométrica .....        | 85  |
| 4.7.3            | Experimentos finales .....                                   | 89  |
| 4.8              | Resultados de la concentración de lípidos de microalgas..... | 91  |
| CAPÍTULO 5 ..... |  | 93  |
| 5                | Conclusiones y recomendaciones .....                         | 93  |
| 5.1              | Cultivo de microalgas a escala laboratorio.....              | 93  |
| 5.2              | Dosificación de carbono .....                                | 93  |
| 5.3              | Puesta en marcha del respirómetro. ....                      | 94  |
| 5.4              | Extracción de lípidos .....                                  | 94  |
| REFERENCIAS..... |  | 96  |
| Anexos .....     |  | 100 |



## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 2.1 Laguna Facultativa, adaptado de (von Sperling, 2007b) .....  | 26 |
| Figura 2.2 Lagunas en Serie .....   | 27 |
| Figura 2.3 Lagunas en Paralelo, adaptado de (Valbuena et al., 2002) .....   | 28 |
| Figura 2.4 Sistema Avanzado de Lagunas (APS), adaptado de (Craggs et al., 2004) .....   | 29 |
| Figura 2.5 Vista lateral de una laguna de algas de alta tasa con la adición de CO <sub>2</sub> (Park et al., 2010).....   | 30 |
| Figura 2.6 Vista lateral de una laguna de sedimentación de algas (Craggs et al., 2004) .....  | 30 |
| Figura 2.7 Relación simbiótica entre algas y bacterias presentes en lagunas facultativas y de maduración (Mara, 2004) .....   | 32 |
| Figura 2.8 Curva de crecimiento de un cultivo de microalgas. 1- Fase de latencia; 2- Fase exponencial; 3- Fase de crecimiento lineal; 4- Fase estacionaria; 5- Fase de muerte (Fogg and Thake, 1987)..... | 36 |
| Figura 2.9 Curva intensidad de luz vs Tasa de fotosíntesis (Richmond, 2004).....  | 39 |
| Figura 3.1 Inóculo de microalgas .....  | 48 |
| Figura 3.2 Materiales usados para la elaboración del fotobioreactor .....   | 50 |
| Figura 3.3 Compuestos para la preparación del medio de cultivo .....  | 51 |
| Figura 3.4 Balanza de precisión .....   | 51 |
| Figura 3.5 Montaje del cultivo de microalgas .....  | 52 |
| Figura 3.6 Turbidímetro Turb 555.....   | 53 |
| Figura 3.7 Materiales usados para el recuento celular .....   | 54 |
| Figura 3.8 Preparación de la muestra .....  | 55 |
| Figura 3.9 Cámara de Neubauer.....  | 55 |
| Figura 3.10 Recuento celular .....  | 56 |
| Figura 3.11 a) Conteo en cuatro cuadrículas; b) Recuento en zigzag.....   | 56 |
| Figura 3.12 Procedimiento para análisis de Turbiedad .....  | 58 |
| Figura 3.13 Materiales empleados para la cosecha de microalgas.....   | 59 |
| Figura 3.14 Materiales usados para la deshidratación de la biomasa.....   | 60 |
| Figura 3.15 Procedimiento para la cosecha de microalgas .....   | 61 |



|  |    |
|--|----|
| Figura 3.16 a) Separación de microalgas mediante centrifugación; b) Colocación segura de muestras en el rotor.....           | 61 |
| Figura 3.17 Procedimiento de filtración y secado de la biomasa algal .....   | 62 |
| Figura 3.18 Liofilizador .....   | 63 |
| Figura 3.19 Respirómetro.....  | 64 |
| Figura 3.20 pH-metro y Luxómetro.....  | 64 |
| Figura 3.21 Transmisor M400 para acondicionamiento de señales .....  | 65 |
| Figura 3.22 Tarjeta de adquisición de datos .....  | 65 |
| Figura 3.23 Adquisición de datos .....   | 67 |
| Figura 3.24 Control de irradiación .....   | 68 |
| Figura 3.25 Control de hora y fecha .....  | 68 |
| Figura 3.26 Configuración convencional de un extractor Soxhlet.....  | 69 |
| Figura 3.27 Materiales usados para la extracción de lípidos.....   | 70 |
| Figura 3.28 Montaje para la extracción Soxhlet .....   | 72 |
| Figura 3.29 Extracción de lípidos mediante método Soxhlet.....   | 73 |
| Figura 4.1 Especies de microalgas cultivadas a escala laboratorio .....  | 76 |
| Figura 4.2 Curva de crecimiento de un cultivo de la familia Chlorella .....  | 78 |
| Figura 4.3 Diagrama de cajas de las tasas de crecimiento .....   | 80 |
| Figura 4.4 Análisis de remoción de nutrientes.....   | 82 |
| Figura 4.5 Implementación de cultivos de microalgas y respirómetro .....   | 83 |
| Figura 4.6 Panel Frontal del programa de control del respirómetro .....  | 84 |
| Figura 4.7 Curvas típica de la variación de oxígeno disuelto y temperatura obtenida de cuatro cultivos.....                  | 86 |
| Figura 4.8 Variación diaria de OD y Temperatura de un cultivo de Chlorella   | 88 |
| Figura 4.9 Variación diaria de OD e Irradiación, especie Chlorella de 9H00 a 19H00.....                                      | 89 |
| Figura 4.10 Variación de pH.....   | 90 |
| Figura 5.1 Flujograma de producción de biocombustible a partir de microalgas adaptado de (Arias Peñaranda et al., 2013)..... | 95 |



## Lista de Tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 2.1 Especies de algas presentes en lagunas facultativas y de maduración (Shilton, 2005) .....                                     | 34 |
| Tabla 2.2: Tasas específicas de crecimiento para algunas especies (Lee, 2001).<br>.....   | 38 |
| Tabla 2.3 Contenido de Lípidos de algunas microalgas (Arias Peñaranda et al., 2013) .....   | 44 |
| Tabla 3.1 Solventes usados para la extracción Soxhlet en orden de ascendente según el índice de polaridad (Ramluckan et al., 2014)..... | 71 |
| Tabla 4.1 Tasas de crecimiento y fuentes de carbono y nitrógeno de la familia Chlorella .....   | 79 |
| Tabla 4.2 Tasas de crecimiento promedio para la familia Chlorella .....   | 81 |
| Tabla 4.3 Formato de salida del registro de datos .....   | 85 |
| Tabla 4.4 Análisis de crecimiento por turbiedad.....  | 90 |
| Tabla 4.5 Porcentaje de lípidos más clorofila obtenidos mediante extracción Soxhlet .....   | 91 |



## Lista de Símbolos

|           |  |
|-----------|--|
| $t_d$     | Tiempo de duplicación                                |
| $N_o$     | Número inicial de células                            |
| $n$       | Número de duplicaciones                              |
| $N_t$     | Número de células                                    |
| $\mu$     | Tasa específica de crecimiento                       |
| $I_c$     | Intensidad de luz en el punto de compensación        |
| $I_s$     | Intensidad de luz en el punto de saturación          |
| $I_h$     | Intensidad de luz en el punto de inhibición          |
| $C_{t+1}$ | Concentración celular en el tiempo $t+1$             |
| $C_t$     | Concentración celular en el tiempo $t$               |
| $N_1$     | Número de células en el tiempo $t_1$                 |
| $N_2$     | Número de células en el tiempo $t_2$                 |
| $P_0$     | Peso del matraz de destilación vacío                 |
| $P_f$     | Peso del matraz de destilación más lípidos extraídos |



## Lista de Siglas

|         |  |
|---------|--|
| WSP     | Waste Stabilisation Ponds                                |
| HRAP    | High Rate Algal Pond                                     |
| PTARs   | Plantas de Tratamiento de Agua Residual                  |
| UV      | Ultravioleta   |
| OMS     | Organización Mundial de la Salud                         |
| VIP     | Letrina de pozo mejorada con ventilación                 |
| UNICEF  | United Nations Children's Fund                           |
| DBO     | Demanda Bioquímica de Oxígeno                            |
| DQO     | Demanda Química de Oxígeno                               |
| APS     | Advanced Pond System                                     |
| AFPs    | Advanced Facultative Ponds                               |
| ASPs    | Algae Settling Ponds                                     |
| MP      | Maturation Pond  |
| OUR     | Oxygen Uptake Rate                                       |
| IWA     | International Water Association                          |
| VLIR    | Vlaamse Interuniversitaire Raad                          |
| DIUC    | Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca   |
| LabVIEW | Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench |
| OD      | Oxígeno Disuelto   |
| NTU     | Nephelometric Turbidity Unit                             |



Universidad de Cuenca  
Cláusula de derechos de autor

---

Yo, María Alexandra Cabrera Cabrera autora de la tesis **“LÍNEA BASE PARA EL APROVECHAMIENTO DE MICROALGAS DE SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL”**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Civil. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 1 de Septiembre de 2014

---

María Alexandra Cabrera Cabrera

C.I: 0106049596



Universidad de Cuenca  
Clausula de propiedad intelectual

---

Yo, María Alexandra Cabrera Cabrera, autora de la tesis **“LÍNEA BASE PARA EL APROVECHAMIENTO DE MICROALGAS DE SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 1 de Septiembre de 2014

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'María Alexandra Cabrera Cabrera', written over a horizontal line.

María Alexandra Cabrera Cabrera

C.I: 0106049596



Universidad de Cuenca  
Clausula de derechos de autor

---

Yo, María Fernanda Pulla Tenemaza autora de la tesis **“LÍNEA BASE PARA EL APROVECHAMIENTO DE MICROALGAS DE SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL”**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Civil. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 1 de Septiembre de 2014

María Fernanda Pulla Tenemaza

C.I: 0104828991



Universidad de Cuenca  
Clausula de propiedad intelectual

---

Yo, María Fernanda Pulla Tenemaza, autora de la tesis **"LÍNEA BASE PARA EL APROVECHAMIENTO DE MICROALGAS DE SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL"**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 1 de Septiembre de 2014

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'M' and 'F' followed by 'PULLA'.

María Fernanda Pulla Tenemaza

C.I: 0104828991



## Agradecimiento

Agradecemos de manera muy especial al Ing. Andrés Alvarado Martínez por su valioso aporte en la dirección de esta investigación, por su apoyo disponibilidad, paciencia y confianza en nosotras, por su capacidad de guiar nuestras ideas no solo en el desarrollo de esta tesis sino también en nuestra formación profesional, académica y personal. Agradecemos igualmente la gestión realizada para facilitar todos los recursos para el desarrollo y culminación de este proyecto.

Queremos también agradecer al Ing. Juan Fernando Cisneros por el interés mostrado en nuestro trabajo colaborándonos con sus sugerencias, conocimientos y experiencias que han sido un aporte fundamental para el desarrollo de esta tesis, así como para nuestra formación académica y personal.

A la Dra. Guillermina Pauta y al personal del laboratorio de Sanitaria de la Facultad de Ingeniería por todo el apoyo brindado para la realización de esta investigación.

Al proyecto “Plantas Medicinales” en especial a la Bioquímica Farmacéutica Jessica Calle por su colaboración durante el desarrollo de este proyecto.

Finalmente agradecemos a la Universidad de Cuenca por brindarnos la oportunidad de prepararnos profesionalmente, contando con docentes calificados que aportaron en nuestra formación.

*Las autoras*



## Dedicatoria

Dedico esta tesis a toda mi familia en especial a mis padres, abuelitos, sobrinos y hermanos que han sido el pilar fundamental en mi vida, a todos mis amigos por el apoyo incondicional brindado. También a todas las personas que han aportado valiosamente para el desarrollo de esta tesis, y en mi formación como profesional y persona.

*Alex*

Dedico esta tesis a mis queridos padres Inés y Rubén que con mucho amor, paciencia y sacrificio me han apoyado y motivado durante toda mi vida. A mis hermanos Karina y Paúl por su apoyo incondicional en todo momento, a mi sobrino Lionel por llenarme de alegría en todos estos días, a mi enamorado por su paciencia, comprensión y ayuda cuando más lo necesitaba, y a mis amigos por todo el apoyo brindado.

*Fer*



# CAPÍTULO 1

## 1 Introducción

### 1.1 Antecedentes

El tratamiento de aguas residuales es un proceso imprescindible en el saneamiento integral de un asentamiento humano que tiene como objetivo evitar afectaciones a la salud pública y preservar la calidad ambiental de los cuerpos acuáticos receptores. El tratamiento convencional de aguas residuales consiste normalmente en un tratamiento primario y secundario que elimina el material sedimentado y oxida la materia orgánica, finalmente se obtiene un efluente aparentemente limpio que es descargado al cuerpo receptor, sin embargo este efluente comúnmente contiene altos contenidos de nutrientes (Fósforo y Nitrógeno principalmente) que pueden causar eutrofización al cuerpo receptor. Debido a esto en numerosas ocasiones resulta necesario dar un tratamiento terciario al agua residual. En este sentido, las microalgas son utilizadas en varias tecnologías de tratamiento de agua residual de alta eficiencia como lagunas de estabilización y lagunas de algas de alta tasa (WSP y HRAP por sus siglas en inglés respectivamente), debido a su capacidad de oxidar el carbón inorgánico y asimilar nutrientes, tanto en etapas primarias, secundarias y terciarias del tratamiento (Abdel-Raouf et al., 2012).

Las microalgas, además de ser altamente eficientes en el tratamiento de aguas residuales, son microorganismos que tienen un alto contenido de lípidos que se pueden aprovechar como fuente de biocombustible, ya que los métodos actuales de cultivo de microalgas para producción de biocombustibles resultan costosos (Jonker and Faaij, 2013), por lo que una alternativa económica y ambientalmente viable sería aprovechar los efluentes de WSP y HRAP, que contienen altas concentraciones de biomasa algal (Durazno, 2009).

Las plantas de tratamiento de agua residual (PTARs) situadas en altura son eficientes en la remoción y producción de sólidos biológicos en un rango muy similar a aquellas de llanura. Esto se debe a la rápida adaptación de los microorganismos a las condiciones ambientales (Mara, 2004). Conociendo la gran variedad de microalgas presentes en estos sistemas (Pearson, 2005) y a la alta irradiación UV a la que son expuestas en zonas mediterráneas de altura, en la que se incluye a la sierra Ecuatoriana, se espera una gran variabilidad en los parámetros biocinéticos de varias especies.



## 1.2 Justificación

El desgaste de las reservas de combustibles fósiles, ha provocado la necesidad de investigar nuevas fuentes de energía que sean renovables (Santacesaria et al., 2012). Una alternativa altamente fiable es el biocombustible producido mediante la transesterificación de lípidos extraídos de microalgas, con una huella de carbono neutral, siendo una tecnología que no compite con cultivos agrícolas tradicionales como la caña de azúcar, remolacha, maíz, soya, etc. que conducen a una precipitada destrucción de bosques, escasez de agua y cambios de uso de tierras. Las microalgas pueden aprovechar los sistemas de tratamiento de agua residual como medio de cultivo para desarrollarse (Brennan and Owende, 2010).

Sin embargo para el aprovechamiento de microalgas presentes en sistemas de tratamiento de aguas residuales WSP y HRAP se requiere un detallado conocimiento de los procesos biológicos que ocurren en estos, lo cual puede ser facilitado con la implementación de modelos matemáticos (Alvarado et al., 2012; Sah et al., 2012), estos sin embargo, requieren una precisa descripción de los parámetros cinéticos que se pueden obtener mediante técnicas respirométricas (Decostere et al., 2013; Petersen et al., 2001).

En nuestro medio, no se han reportado mediciones cinéticas precisas de microalgas de sistemas lagunares, por lo que, una completa caracterización de la composición oleaginosa y la cinética de microalgas presentes en sistemas de tratamiento lagunares de altura es el primer paso para un potencial aprovechamiento de estos microorganismos, con la finalidad de mejorar el tratamiento de PTARs, y además de conocer la factibilidad de implementar sistemas destinados a la producción de microalgas para la producción de biocombustibles en las condiciones expuestas de la serranía ecuatoriana.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

- Contribuir al conocimiento científico y práctico respecto de las microalgas presentes en sistemas naturales.
- Incorporar conocimiento científico y experimental al Laboratorio de Sanitaria de la Facultad de Ingeniería.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Diseñar y configurar el ensayo experimental de respirometría a escala de laboratorio.



- Diseñar un procedimiento experimental para la obtención de los parámetros biocinéticos más importantes de las microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual mediante respirometría y gravimetría.
- Analizar condiciones ambientales para el óptimo crecimiento de las microalgas.
- Diseñar un procedimiento experimental para el análisis del potencial aprovechamiento de los lípidos de las microalgas como biocombustibles con procedimientos gravimétricos.

## 1.4 Descripción General

La presente tesis inicia con una introducción general y los objetivos de la investigación en el capítulo 1. En el capítulo 2 se encuentra una revisión del estado del arte que se enfoca en el tratamiento de aguas residuales, sobre todo en los sistemas lagunares de tratamiento como lagunas de estabilización y lagunas de algas de alta tasa. Además se analizan los procesos microbiológicos que ocurren en estos sistemas. En este mismo capítulo se caracteriza el crecimiento de microalgas así como los parámetros que se pueden medir con la implementación de un respirómetro a escala laboratorio, además de los procesos para la obtención de lípidos de microalgas. En el capítulo 3 se detallan los materiales y métodos empleados en la experimentación con microalgas, así mismo la metodología para la configuración de un respirómetro a escala laboratorio y la obtención de lípidos de microalgas para el aprovechamiento como fuente de biocombustible.

El capítulo 4 se describen los resultados obtenidos a lo largo de la experimentación junto con una discusión de los mismos, y finalmente en el capítulo 5 se exponen las conclusiones más importantes de la investigación y las perspectivas futuras en esta área del conocimiento.

## CAPÍTULO 2

### 2 Revisión de Literatura

#### 2.1 Introducción

Conforme los asentamientos humanos crecen y se desarrollan, aumenta la generación de desechos, estos pueden ser sólidos, gaseosos y líquidos. Dentro de los desechos líquidos tenemos principalmente aguas residuales domésticas y aguas residuales industriales, generadas a partir de los diferentes usos del agua proveniente del agua de abastecimiento (Metcalf and Eddy, 1995).

Las aguas residuales contienen una alta cantidad de materia orgánica que está compuesta de microorganismos patógenos, sustancias peligrosas causantes de enfermedades y que su descomposición genera malos olores, contienen también compuestos tóxicos, además de nutrientes que sirve de alimento para la proliferación de plantas acuáticas (Metcalf and Eddy, 1995). Debido a esto surge la necesidad de eliminar los agentes causantes de la contaminación presentes en las aguas residuales mediante un tratamiento adecuado, mejorando así el nivel de saneamiento de una comunidad.

La organización mundial de la salud (OMS) dentro de los objetivos de desarrollo del milenio busca reducir para el 2015, a la mitad el porcentaje de personas que carecen de acceso al agua potable y al saneamiento básico. Según la OMS el “saneamiento básico es la tecnología de más bajo costo que permite eliminar higiénicamente las excretas y el agua residual, además de tener un medio ambiente limpio y sano tanto en la vivienda como en las proximidades de los usuarios”, como por ejemplo: Descarga (automática o manual) a cualquier lugar, Letrina de pozo sin losa/pozo abierto, Letrina de balde, Retrete colgante/letrina colgante, Instalaciones públicas y compartidas.

El saneamiento mejorado según la OMS es una instalación que separa de manera higiénica las heces humanas del contacto humano, como por ejemplo descarga (automática o manual) a red de alcantarillado, tanque séptico o letrina de pozo, Letrina de pozo mejorada con ventilación (VIP), Letrina de pozo con losa, Inodoro de compostaje.

Según el programa de monitoreo de agua y saneamiento de la OMS y de la UNICEF en Latinoamérica el acceso al agua y al saneamiento todavía es insuficiente, solo el 77% de la población cuenta con un saneamiento adecuado, alrededor del 51% tiene cobertura al sistema de alcantarillado pero únicamente el

10% del agua residual recolectada es dirigida a una planta de tratamiento, del cual menos del 5% del aguas recibe tratamiento ya que en muchos de los casos las plantas de tratamiento no funcionan adecuadamente.

## 2.2 Tratamiento de Agua Residual

Las aguas residuales generadas por las actividades de los asentamientos poblacionales son recolectadas por diferentes sistemas de alcantarillado y en última instancia son descargadas en cuerpos acuáticos receptores. La complejidad sobre la cantidad y calidad de los contaminantes que deben ser removidos para proteger el medio ambiente y hasta qué grado, debe ser analizada en cada caso particular. Una resolución óptima para esta situación debe hacerse en base de las diferentes condiciones locales y las necesidades de cada población, aplicando conocimientos científicos y consideraciones legales existentes (Metcalf and Eddy, 1995).

Lo que se busca con el tratamiento de aguas residuales es acelerar los procesos que se generan en la autodepuración de una masa de agua en la naturaleza, con el objetivo de producir agua limpia o reutilizable en el ambiente y un residuo sólido beneficioso para su disposición final o reutilización (Piedrola, 2000).

El tratamiento de agua residual consiste básicamente en un conjunto de operaciones físicas, y procesos químicos y biológicos, denominados también operaciones y procesos unitarios respectivamente (Metcalf and Eddy, 1995) que tienen como finalidad la eliminación de los contaminantes presentes en el agua residual, con el objetivo de preservar la salud pública, evitando enfermedades como diarrea, fiebre tifoidea, paratifoidea, cólera, hepatitis viral, amebiasis, giardiasis, entre otras, las cuales están directamente relacionadas con la presencia de microorganismos patógenos como bacterias, virus y parásitos en el agua residual (Rengel, 2000). Además se logra proteger a los cuerpos de agua receptores y su ecosistema, logrando disminuir el impacto negativo al medio ambiente (Mara, 2004).

Conforme los niveles de tratamiento aumentan, la calidad del agua tratada mejora (Crites and Tchobanoglous, 2000). Básicamente se identifican cuatro niveles para el tratamiento del agua residual, estos son: preliminar, primario, secundario y terciario (von Sperling, 2007b)

- **Tratamiento preliminar o pre tratamiento:** busca disminuir los sólidos más gruesos como arenas, gravas, plásticos y otros materiales flotantes, con la finalidad de proteger las instalaciones y

funcionamiento de las mismas; y reducir condiciones indeseables relacionadas con la apariencia estética de las plantas (Rengel, 2000).

- **Tratamiento primario:** remueve, mediante operaciones físicas tales como tamizado y sedimentación, los sólidos suspendidos y un pequeño porcentaje de materia orgánica (von Sperling, 2007b).
- **Tratamiento secundario:** elimina materia orgánica biodegradable y sólidos suspendidos mediante procesos químicos y biológicos, además reduce la concentración de compuestos nitrogenados y uniformiza las cargas orgánicas para tratamientos posteriores (Rengel, 2000).
- **Tratamiento terciario o avanzado:** remueven nutrientes como nitrógeno y fósforo mediante una combinación de procesos y operaciones unitarias (Metcalf and Eddy, 1995).

Si bien con el tratamiento del agua residual se logra disminuir la capacidad infecciosa de ésta y se mejora efectivamente la calidad del efluente antes de que sea vertido al cuerpo receptor; existen ciertos problemas que en una planta de tratamiento se pueden generar, entre los más frecuentes tenemos los impactos ambientales relacionados con los malos olores que afectan a la población aledaña a la planta depuradora y la disposición final de los lodos provenientes de las unidades de tratamiento (Metcalf and Eddy, 1995). Por lo que es necesaria la correcta disposición y de ser necesario la reutilización tanto de los lodos como del efluente, analizando previamente su calidad y los requerimientos para que puedan ser reutilizadas.

En la actualidad se dispone de varias tecnologías para el tratamiento del agua residual, dentro de ellas cabe destacar: los sistemas de lodos activados convencionales, zanjas de oxidación, biofiltros, humedales artificiales, lagunas de estabilización (*Waste Stabilisation Ponds*) (WSP), lagunas de algas de alta tasa (*High Rate Algal Pond*) (HRAP), entre otras. De estas tecnologías se destacarán los sistemas lagunares WSP y HRAP, ya que en estos se genera una alta producción de microalgas que son aprovechadas para la remoción de nutrientes.

## 2.3 Sistemas Lagunares

### 2.3.1 Introducción

Las investigaciones sobre los sistemas lagunares para el tratamiento de agua residual, realizadas en la década de 1940 han permitido su desarrollo como una alternativa de tratamiento de bajo costo (Crites and Tchobanoglous, 2000), por lo que actualmente es una de las tecnologías más utilizadas por industrias, pueblos y ciudades de países en vías de desarrollo (Shilton, 2005). Además estos sistemas

pueden funcionar de forma independiente o en combinación con otros sistemas de tratamiento (Crites and Tchobanoglous, 2000).

Los sistemas lagunares poseen una profundidad variable, en donde se incluye la eliminación de sólidos mediante sedimentación, además de procesos de desinfección, reducción de compuestos orgánicos (Demanda Bioquímica de Oxígeno DBO y Demanda Química de Oxígeno DQO) y en algunos casos, en donde se requiera un tratamiento terciario, se remueven nutrientes y metales pesados (Shilton, 2005).

### 2.3.2 Lagunas de estabilización (WSP)

Las primeras investigaciones sobre lagunas de estabilización fueron realizadas en Estados Unidos mediante códigos de diseño como el “*Ten States Standards*”; además de la participación de dos profesores de ingeniería, Bill Oswald en EE.UU y Gerrit Marais en Sudáfrica, que con base en sus investigaciones se han fundamentado los principios básicos de los sistemas WSP (Mara, 2009). La primera vez que se instaló una laguna de estabilización para tratar aguas residuales domésticas fue en Dakota del Norte, EE.UU en 1948, desde entonces se han construido muchos de estos sistemas en varios países alrededor del mundo (Yáñez, 1993).

Los sistemas WSP están conformados por una serie de lagunas grandes, que generalmente son rectangulares o cuadradas y de poca profundidad, menores a 5 m, en las que se tratan las aguas residuales crudas mediante procesos naturales donde interactúa la biomasa (bacterias, algas, protozoarios, etc.), la materia orgánica del desecho y otros procesos naturales, en periodos de retención relativamente altos medidos comúnmente en días (Mara, 2004; Rengel, 2000; Yáñez, 1993).

Las lagunas de estabilización son un sistema de tratamiento biológico de mucha utilidad en el tratamiento de agua residual especialmente en el sector rural (Rengel, 2000), entre las principales ventajas tenemos (Shilton, 2005; Mara, 2004):

- Simplicidad de construcción, operación y mantenimiento mínimo.
- Generalmente son de bajo costo, ya que no requiere de energía eléctrica para su operación, sin embargo esto depende de los costos de los terrenos y del costo de la oportunidad del capital.
- Las lagunas de estabilización son altamente eficientes, pueden remover más del 90% de la DBO soluble, sólidos suspendidos y más del 90% del nitrógeno amoniacal. Además son capaces de remover eficientemente bacterias fecales, virus, huevos de helmintos, E. coli.

- Son más resistentes al choque de cargas orgánicas e hidráulicas que otros procesos de tratamiento de aguas residuales.

Sin embargo como todo tratamiento de agua residual, los sistemas de lagunas de estabilización tienen algunas desventajas, entre las cuales se podría presentar:

- Liberación de olores
- Ocupación de terrenos, debido a que las lagunas de estabilización requieren terrenos mucho más amplios que los sistemas convencionales.
- Mala calidad del efluente

Algunas de estas desventajas pueden ser resultado de una mala operación y mantenimiento, o por permitir que sean sobrecargadas; también podrían deberse a un mal diseño, o inclusive cuando el diseñador teniendo experiencia en sistemas WSP en Europa o América del Norte, desconoce cómo diseñar WSP en climas más cálidos (Mara, 2004).

### **2.3.2.1 Clasificación de lagunas de estabilización**

Las lagunas de estabilización pueden clasificarse de varias formas, a continuación explicaremos algunas de ellas:

#### **2.3.2.1.1 De acuerdo al contenido de oxígeno pueden ser:**

- Lagunas anaerobias:

Son comúnmente la primera unidad de tratamiento en una serie de lagunas de estabilización (Mara, 2004). Su profundidad oscila entre los 2 y 5 metros, con períodos de retención pequeños (entre 1 y 3 días), sus dimensiones son más pequeñas que las lagunas facultativas y el oxígeno que se consume es mayor al que se produce, por tal motivo predominan las condiciones anaerobias (von Sperling, 2007b), en consecuencia de ello la presencia de algas es insignificante o nula (Shilton, 2005).

Estas lagunas son diseñadas para recibir altas cargas orgánicas y su principal función es la remoción de DBO, que con cortos tiempos de retención pueden eliminar hasta más del 60% de carga orgánica, a través de la precipitación de sólidos sedimentables y la digestión de los mismos (Mara, 2004).

- Lagunas aerobias:

Son conocidas también como lagunas de alta producción de biomasa o fotosintéticas que tienen profundidades reducidas que van de 30 a 45 cm, lo que favorece la penetración de luz hasta el fondo. Son diseñadas para obtener la

máxima producción de algas en cortos períodos de retención. Estas lagunas son preferentemente empleadas en sitios de clima cálido y con buena radiación solar para la producción y cosecha de algas (Yáñez, 1993).

- Lagunas facultativas:

Son diseñadas para remover baja carga orgánica, con lo que contribuyen al desarrollo de las algas. Además se establecen dos tipos de lagunas facultativas, las denominadas primarias que son aquellas a las que llega el agua residual cruda, es decir sin tratar; y las secundarias las cuales reciben agua residual decantada proveniente por lo general de las lagunas anaerobias (Mara, 2004).

En este tipo de lagunas, como se muestra en la Figura 2.1, se pueden identificar tres zonas, estas son la anaerobia, que ocurre en el fondo de la laguna debido a la sedimentación de una parte de materia orgánica y a la escasa presencia de oxígeno predominando los procesos anaerobios. La zona facultativa, que se ubica entre la zona aerobia y la anaerobia, en esta parte las bacterias sobreviven con o sin la presencia de oxígeno; y finalmente la zona aerobia, que se encuentra en la parte superior de la laguna en la que existe alta concentración de oxígeno debido a la actividad fotosintética de las algas (von Sperling, 2007a; Shilton, 2005).

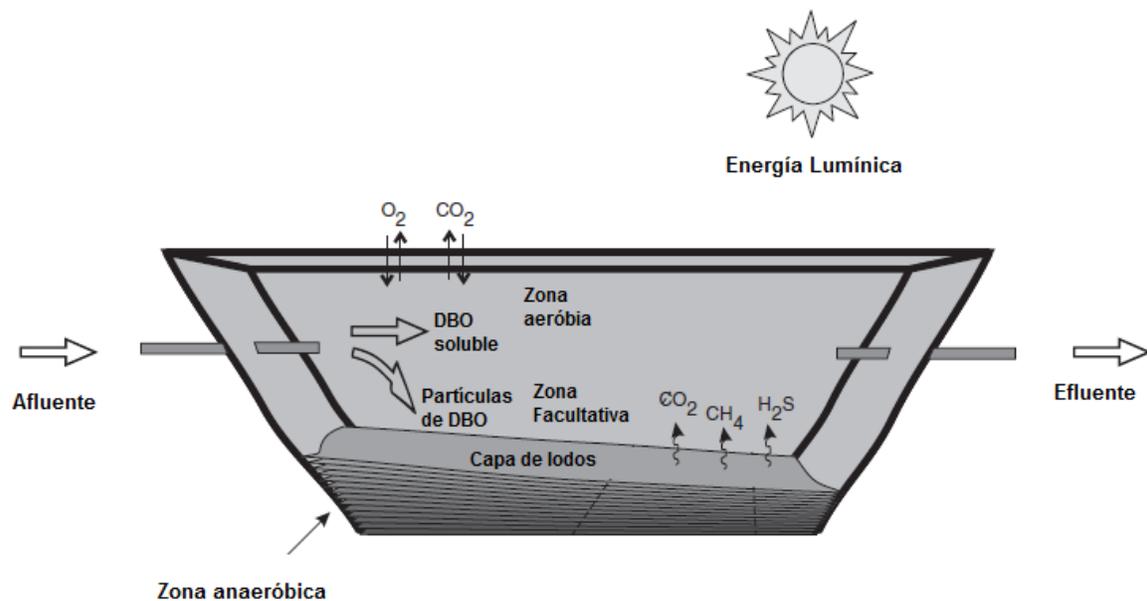


Figura 2.1 Laguna Facultativa, adaptado de (von Sperling, 2007b)

### 2.3.2.1.2 De acuerdo al lugar que ocupan, con relación a otros procesos (Yáñez, 1993):

- Lagunas primarias o de aguas residuales crudas.
- Secundarias cuando reciben efluentes de otros procesos de tratamiento.

- De maduración: estas generalmente se emplazan después de las lagunas facultativas y se puede implementar una o varias de ellas. Su principal función es remover organismos patógenos como bacterias fecales y virus, además nutrientes, sólidos suspendidos y DBO aunque de forma lenta (Shilton, 2005). Las lagunas de maduración son aerobias en toda su profundidad y tienen menos estratificación que las lagunas facultativas. La profundidad típica es de 1 m con lo que se logra mayor remoción de bacterias y virus fecales, debido a la penetración de luz (Mara, 2004). Eliminan eficientemente coliformes fecales hasta un 99.9999%, y son muy eficientes en la remoción de huevos de helminto y quistes de protozoarios, permitiendo reusar el agua residual tratada (von Sperling, 2007b).

### 2.3.2.1.3 De acuerdo con la secuencia de las unidades (Yáñez, 1993):

- Lagunas en serie, estas tienen relación fundamental con la topografía del terreno y con el nivel de calidad del efluente que se requiera. Su configuración puede ser como la mostrada en la Figura 2.2.

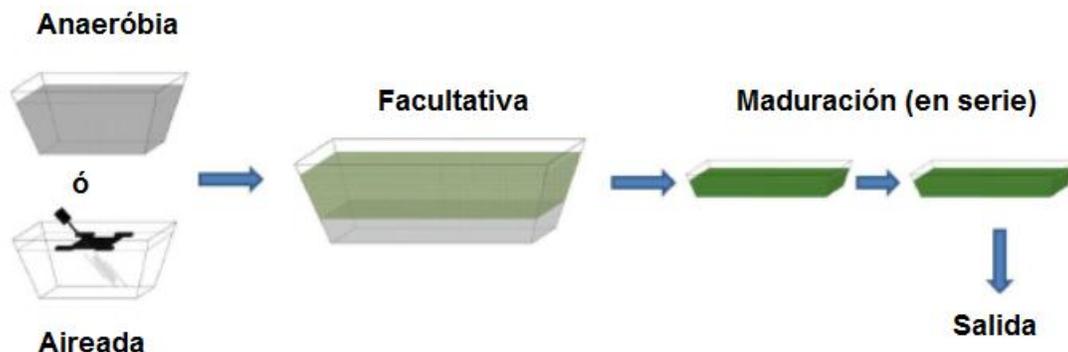


Figura 2.2 Lagunas en Serie

- Lagunas en paralelo, estas tienen relación con las etapas de implementación, la topografía del terreno, y las condiciones de operación y mantenimiento de la instalación, en la Figura 2.3 se muestra la configuración de este tipo de lagunas.

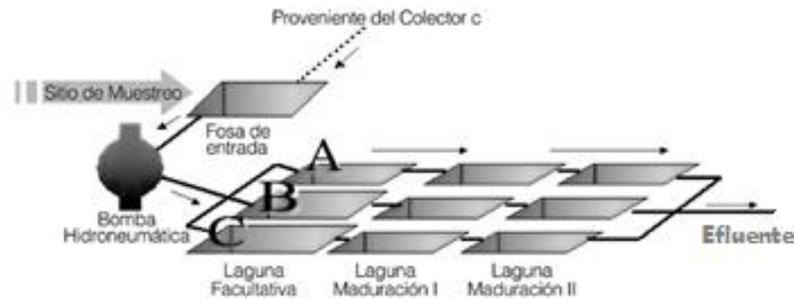


Figura 2.3 Lagunas en Paralelo, adaptado de (Valbuena et al., 2002)

#### 2.3.2.1.4 De acuerdo con las condiciones de descarga (Yáñez, 1993):

- Lagunas de descarga continua.
- Lagunas de retención completa, estas son también llamadas lagunas terminales no poseen efluente, y el líquido es dispuesto por percolación y evaporación.
- Lagunas de descarga controlada, llamadas también de flujo intermitente, de regulación o de almacenamiento, son diseñadas con fines específicos como: almacenamiento total del líquido durante el invierno, regulación del caudal previo a la reutilización agrícola y reducción de microorganismos.

#### 2.3.2.1.5 De acuerdo con la función específica (Yáñez, 1993):

- Lagunas para la reducción de compuestos orgánicos.
- Lagunas para la reducción de organismos patógenos.
- Lagunas para criterios múltiples de calidad del efluente.

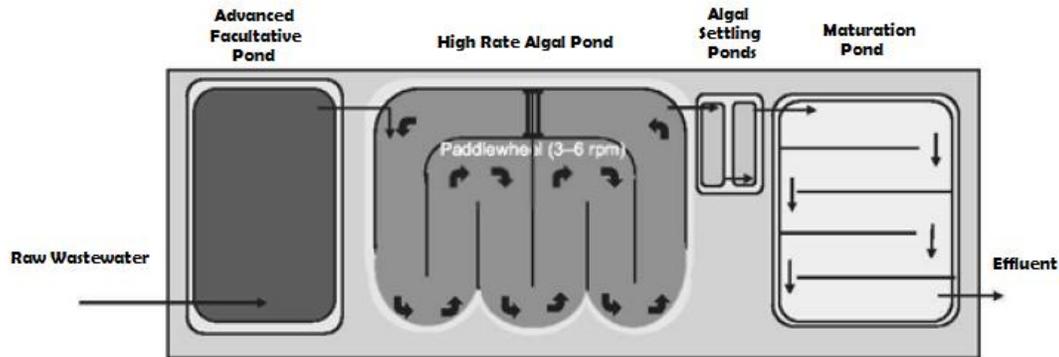
### 2.3.3 Lagunas de Algas de Alta Tasa (HRAP)

El tratamiento de aguas residuales mediante lagunas de algas de alta tasa (HRAP) fue por primera vez propuesto en la década de 1960 por el profesor William Oswald en la Universidad de California en Berkeley. Estas fueron originalmente diseñadas para maximizar la producción de algas en un ambiente totalmente aeróbico (von Sperling, 2007b; Mara, 2004). Sin embargo en los últimos años se han aprovechado para el tratamiento de aguas residuales ya que eliminan nutrientes debido a la asimilación de las microalgas, amoníaco por la volatilización y fosfato mediante sedimentación (Park et al., 2010; Craggs et al., 2003).

En términos de huella hídrica los sistemas HRAP ocasionan menos impacto ambiental que otros sistemas de producción comercial de algas, debido a que se producen algas mientras se trata el agua residual, disminuyendo el uso de energía y fertilizantes, además eliminan nutrientes que se encuentran en aguas residuales con lo que se evita la eutrofización del cuerpo receptor (Park et al., 2010). Sin

embargo existen pocos de estos sistemas en el mundo, esto se debe principalmente a que este es un proceso complejo para el tratamiento de aguas residuales (Mara, 2004), aunque con la creciente presión de normas regulatorias que pretenden mejorar la eliminación de nutrientes, la posterior recolección de las microalgas, la producción de energía renovable, los sistemas HRAP pueden llegar a ser una de las tecnologías más usadas y aplicadas en un futuro (Park et al., 2010).

Los sistemas HRAP normalmente forman parte de un sistema avanzado de lagunas (*Advanced Pond System*) (APS) que consiste de lagunas facultativas avanzadas, seguido de pozos de digestión anaerobia, lagunas de algas de alta tasa, lagunas de sedimentación de algas y una serie de lagunas de maduración, cada estanque está diseñado para optimizar determinados procesos de tratamiento (Park et al., 2010), como se muestra en la Figura 2.4.

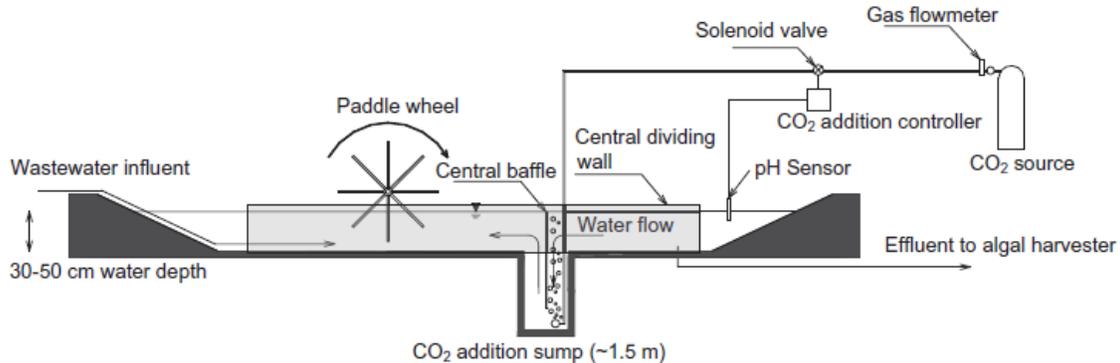


**Figura 2.4 Sistema Avanzado de Lagunas (APS), adaptado de (Craggs et al., 2004)**

Las lagunas facultativas avanzadas (*Advanced Facultative Ponds*) (AFPs) consisten en estanques abiertos profundos de alrededor de cuatro metros, que contienen pozos de fermentación con aproximadamente cuatro metros más de profundidad. Están diseñados para optimizar la sedimentación natural y la fermentación anaerobia del metano de los sólidos orgánicos de las aguas residuales (Craggs et al., 2003)

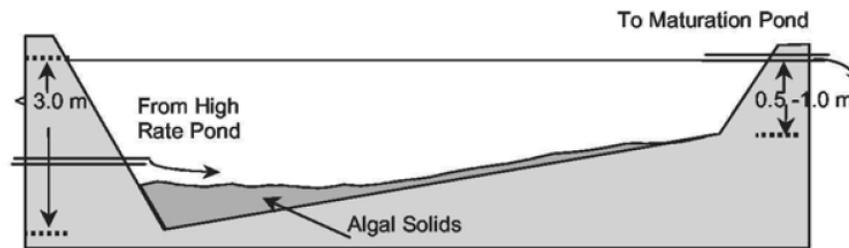
Las lagunas de algas de alta tasa (HRAP) son poco profundas en un rango de 0.2 a 1 metro tienen incorporado una paleta giratoria que mezcla el agua a velocidades de 0.15 a 0.3 m/s haciéndola circular por todo el estanque y evitando que las algas se sedimenten, como se muestra en la Figura 2.5. El sistema está conformado por canalizaciones (*raceway*) que puede estar configurado por uno o varios bucles alrededor de las paredes divisorias centrales, además se puede adicionar  $\text{CO}_2$  para mejorar el crecimiento de las algas. Son diseñadas para remover nutrientes y mejorar la descomposición aerobia de la materia orgánica

restante disuelta en el agua residual con un tiempo de retención alrededor de 2 a 6 días (Park et al., 2010; Mara, 2004).



**Figura 2.5 Vista lateral de una laguna de algas de alta tasa con la adición de CO<sub>2</sub> (Park et al., 2010)**

Las lagunas de sedimentación de algas (*Algae Settling Ponds*) (ASPs) están diseñadas para la sedimentación y eliminación de la biomasa de algas, pueden ser de hasta 3 m de profundidad en el extremo de entrada y se inclina hacia arriba a lo largo de su longitud a una profundidad de 0,5 a 1,0 m en el extremo de salida como se muestra en la Figura 2.6, además suelen tener una relación longitud/ancho de 5:1 (Craggs et al., 2004; Craggs et al., 2003).



**Figura 2.6 Vista lateral de una laguna de sedimentación de algas (Craggs et al., 2004)**

El cuarto estanque que forma parte del sistema avanzado de lagunas es el de maduración (*Maturation Pond*) (Torrents et al.) que consiste de una o varias (en serie), con profundidades de 1 a 3 metros. Están diseñadas principalmente para que el zooplancton consuma las algas restantes, también para aumentar la desinfección natural gracias a la radiación solar UV, más la sedimentación y el consumo de bacterias, materia orgánica soluble y hongos por la presencia de protozoos (Craggs et al., 2004; Craggs et al., 2003).

## 2.4 Microalgas presentes en sistemas lagunares de tratamiento

### 2.4.1 Introducción

La microbiología de los sistemas de tratamiento de agua residual es compleja y muy variada. Los procesos microbiológicos que se llevan a cabo en estos sistemas son de mucha importancia ya que juegan un papel importante para la desinfección del agua residual.

Es importante conocer sobre la microbiología existente en el agua residual, ya que esta contiene microorganismos que pueden causar enfermedades, además en la mayoría de tratamientos de agua residual intervienen procesos microbiológicos (Mara, 2004).

En los sistemas lagunares existen condiciones adecuadas para el desarrollo de microalgas, debido a la alta presencia de luz, Nitrógeno inorgánico (amonio y nitratos) y fósforo, además de metales pesados, que pueden causar eutrofización en los cuerpos receptores. Por lo que los cultivos de microalgas constituyen un tratamiento que ofrece remover de manera altamente eficiente los nutrientes y metales pesados, además de producir biomasa con alto contenido de lípidos que posteriormente se puede utilizar para numerosos propósitos (Abdel-Raouf et al., 2012) aparte de la depuración de aguas residuales como:

- Obtención de sustancias de interés químico-farmacéutico,
- Utilización en alimentos tanto animal como humano,
- Utilización como fertilizantes
- Producción de biocombustible

### 2.4.2 Biología de las algas

Las microalgas se encuentran presentes en todos los ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres, lo que implica una gran variedad de especies que viven en diferentes condiciones ambientales (Richmond, 2004). Estas representan una de las formas de vida más antigua que se conoce, son plantas primitivas que no poseen raíces, tallo ni hojas (Brennan and Owende, 2010) . Las algas pueden ser células procariotas o eucariotas.

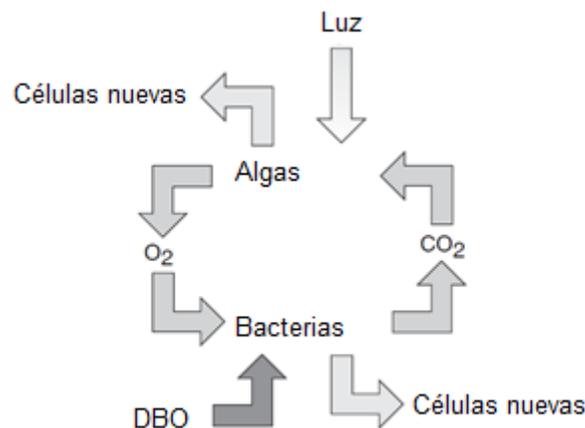
Las procariotas o cyanobacterias no presentan un núcleo definido, sino que su material celular se concentra en una región del citoplasma denominada nucleoide, además carecen de mitocondrias, aparato de Golgi, flagelos y son más parecidos a bacterias que a algas. Las eucariotas a diferencia de las procariotas son células que tienen un núcleo definido, en donde se localiza el material genético. Estas deben su color a la clorofila, carotenoides y xantofilas presentes en su estructura;

las más importantes son las algas verdes o Chlorophyta, algas rojas o Rhodophyta y diatomeas o Bacillariophyta (Ruiz Martínez, 2011; Brennan and Owende, 2010)

Las algas por su forma de sintetizar los compuestos pueden ser autótrofas o heterótrofas. Las autótrofas requieren únicamente de compuestos inorgánicos como  $\text{CO}_2$ , sales y luz para su crecimiento; en cambio las heterótrofas no son fotosintéticas por lo que requieren de una fuente externa de compuestos orgánicos, nutrientes y una fuente de energía; sin embargo existen ciertos géneros que pueden ser mixotróficos, es decir que tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis y adquirir nutrientes orgánicos exógenos (Brennan and Owende, 2010)

### 2.4.3 Procesos de algas en sistemas lagunares

Las microalgas son microorganismos unicelulares que son capaces de llevar a cabo la fotosíntesis en presencia de luz, convirtiendo el carbón inorgánico y agua en oxígeno y materia orgánica; debido a esto el oxígeno que necesitan las bacterias para oxidar el DBO de las aguas residuales es suministrado principalmente por microalgas que crecen de forma natural y profusa en los sistemas lagunares (por lo que tiene un característico color verde); y el dióxido de carbono que necesitan las algas es proporcionado principalmente por las bacterias presentes en los estanques como un producto final de su metabolismo; de esta manera se crea una relación simbiótica entre las algas y las bacterias del estanque (Mara, 2004), un esquema de esto se muestra en la Figura 2.7.



**Figura 2.7 Relación simbiótica entre algas y bacterias presentes en lagunas facultativas y de maduración (Mara, 2004)**

En el proceso de fotosíntesis las algas producen materia orgánica necesaria para su supervivencia, convirtiendo la energía de la luz en energía química. Durante las 24 horas del día ellas respiran, oxidan la materia orgánica producida y liberan energía en los procesos de crecimiento, reproducción, movimiento y otros. El balance entre la producción (fotosíntesis) y el consumo (respiración) de oxígeno

favorecen ampliamente a la fotosíntesis, en efecto las algas pueden producir 15 veces más oxígeno del que ellas consumen. De esta forma en los sistemas lagunares se genera una división entre la parte superficial y la parte oscura de la laguna, en donde existe equilibrio entre el oxígeno que se consume y el que se produce, este punto se denomina *oxypause* (von Sperling, 2007a).

Las microalgas al ser organismos fotosintéticos requieren energía lumínica, debido a esto es común que en los sistemas lagunares estas se sitúen cerca de la superficie de la laguna y a medida que la profundidad de esta desciende, la penetración de luz disminuye por lo que la concentración de microalgas se reduce (von Sperling, 2007a).

#### 2.4.4 Diversidad de las algas

Existe una amplia diversidad de especies de algas y cianobacterias en sistemas de tratamiento lagunar. Comúnmente su concentración está por debajo de los 200 mg/l en términos de sólidos suspendidos secos y pueden estar en un rango de  $10^4$  a  $10^6$  células por ml (Alvarado, 2013). Los géneros y las especies que predominan en las lagunas de tratamiento se desarrollan en función de la carga orgánica que estas reciben, sin embargo una alta carga orgánica provoca que la diversidad de especies disminuya.

Los principales tipos de algas encontradas en los sistemas lagunares son:

**Alga verde (*Chlorophyta*) y alga pigmentada (*pigmented flagellated*) (*Euglenophyta*):** este tipo de algas le dan el característico color verde a la laguna, predominando los géneros: *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Euglena*. *Chlamydomonas* y *Euglena* son usualmente las primeras en desarrollarse, predominan en periodos fríos y poseen flagelos, lo que ayuda a su movilidad optimizando su posición con relación a la incidencia de la luz (von Sperling, 2007a).

**Cyanobacterias (*Cyanophyta* o alga verde azulada):** estas presentan características de alga y bacteria pero actualmente son clasificadas como bacterias. Estos organismos no poseen sistema de locomoción pero son capaces de moverse por deslizamiento. Se pueden proliferar en cualquier ambiente que tenga al menos  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ , agua, algunos minerales y luz. Son organismos de típicas condiciones de bajo pH y poca disponibilidad de nutrientes, siendo este entorno no muy característico en lagunas de estabilización y desfavorable para las algas verdes. Las Cyanobacterias más importantes que están presentes en las lagunas de estabilización son: *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Anacystis* y *Anabaena*. Otro tipo

de microalgas que pueden ser encontradas son: Bacillariophyta y Chrysophyta (von Sperling, 2007a).

En la Tabla 2.1 se muestra una revisión de las especies que con frecuencia se encuentran en las lagunas facultativas y de maduración (Shilton, 2005).

**Tabla 2.1 Especies de algas presentes en lagunas facultativas y de maduración (Shilton, 2005)**

| <b>Algal genus</b>          | <b>Facultative ponds</b> | <b>Maturation ponds</b> |
|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b><i>Euglenophyta</i></b>  |                          |                         |
| Euglena                     | +                        | +                       |
| Phacus                      | +                        | +                       |
| <b><i>Chlorophyta</i></b>   |                          |                         |
| Chlamydomonas               | +                        | +                       |
| Chlorogonium                | +                        | +                       |
| Eudorina                    | +                        | +                       |
| Pandorina                   | +                        | +                       |
| Pyrobotrys                  | +                        | +                       |
| Ankistrodesmus              | -                        | +                       |
| Chlorella                   | +                        | +                       |
| Micractinium                | -                        | +                       |
| Scenedesmus                 | -                        | +                       |
| Selastrum                   | -                        | +                       |
| Carteria                    | +                        | +                       |
| Coelastrum                  | -                        | +                       |
| Dictosphaerium              | -                        | +                       |
| Oocystis                    | -                        | +                       |
| Rhodomonas                  | -                        | +                       |
| Volvox                      | +                        | -                       |
| <b><i>Chrysophyta</i></b>   |                          |                         |
| Navicula                    | +                        | +                       |
| Cyclotella                  | -                        | +                       |
| <b><i>Cyanobacteria</i></b> |                          |                         |
| Oscillatoria                | +                        | +                       |
| Arthrospira                 | +                        | +                       |
| Spirulina                   | -                        | +                       |

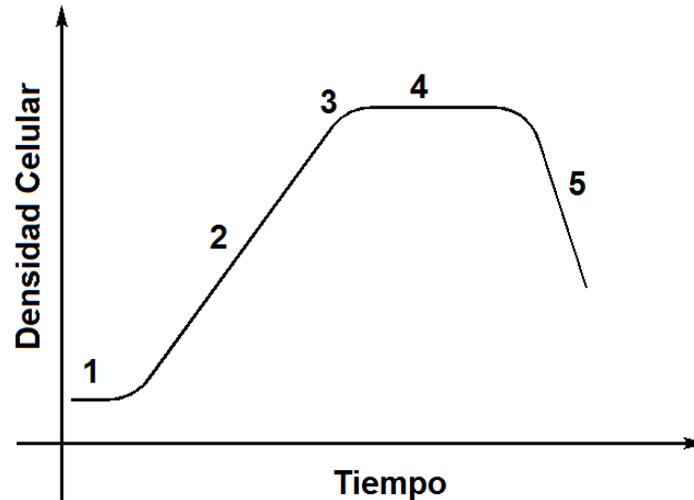
## 2.5 Crecimiento de microalgas

El crecimiento microbiano está influenciado por condiciones físicas y químicas, como la concentración de sustrato o de otros factores limitantes que pueden reducir la tasa de crecimiento. Cada especie y subespecie de microalgas tienen

sus características propias con respecto a ciertas condiciones de crecimiento, así como productividades máximas alcanzadas en diferentes configuraciones de cultivos (Ruiz Martínez, 2011; Richmond, 2004).

Según Lee and Shen (2004) las fases de crecimiento (ver Figura 2.8) que se desarrollan en un cultivo de microalgas son:

- **Fase de latencia o adaptación:** esta se observa en la fase inicial del crecimiento, con frecuencia ocurre un retardo en el desarrollo de las células, debido al ajuste fisiológico por los cambios en las condiciones de nutrientes o del medio de cultivo.
- **Fase Exponencial:** llamada también fase de crecimiento acelerado, en la cual las células se han adaptado a su nuevo entorno, comienzan a multiplicarse y crecen de forma exponencial.
- **Fase de crecimiento lineal:** conforme el cultivo va creciendo se produce una disminución de nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores como consecuencia del incremento de la población (Romo Piñera, 2002). La biomasa empieza a acumularse a una tasa constante, el crecimiento se hace lineal y la energía ya no se produce para la sobrevivencia de las células.
- **Fase estacionaria:** en esta ya no se observa una división celular neta, es decir que el número de células alcanzado se mantiene constante por cierto período de tiempo debido al balance entra la natalidad y la mortalidad que presenta el cultivo.
- **Fase de muerte:** en esta fase las células empiezan a morir, aunque pueden durar en la fase estacionaria semanas e incluso meses (Romo Piñera, 2002).



**Figura 2.8** Curva de crecimiento de un cultivo de microalgas. 1- Fase de latencia; 2- Fase exponencial; 3- Fase de crecimiento lineal; 4- Fase estacionaria; 5- Fase de muerte (Fogg and Thake, 1987)

### 2.5.1 Tasa de crecimiento

El crecimiento de microalgas depende del factor limitante del crecimiento, este es aquel que está presente en cantidades más próximas al mínimo crítico necesario para estos microorganismos. Debido a esto es importante conocer las condiciones óptimas y los límites de tolerancia de las microalgas para todos o el mayor número de parámetros. Sin embargo, estas condiciones o límites para un parámetro, generalmente cambian cuando un segundo parámetro fluctúa, por lo que la influencia de un conjunto de parámetros crea una determinada respuesta en el crecimiento de las microalgas (Romo Piñera, 2002).

Teóricamente la máxima tasa de crecimiento de un cultivo de microalgas debe ser igual a la tasa máxima de fotosíntesis. Sin embargo la productividad de microalgas se ve limitada por factores como: la concentración de nutrientes, intensidad de luz, pH y temperatura (Richmond, 2004).

### 2.5.2 Tiempo de duplicación y tasa específica de crecimiento

Cuando el ambiente del cultivo es favorable y todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las células están presentes en una cantidad suficiente para el crecimiento, es decir, a concentraciones suficientemente altas de modo que cambios menores no afectan significativamente la velocidad de reacción, la mayoría de las algas unicelulares se reproducen asexualmente (Richmond, 2004).

El tiempo requerido para que las algas consigan duplicarse se denomina tiempo de duplicación ( $t_d$ ). También se denomina tiempo de generación, ya que es el tiempo necesario para crecer y producir una generación de células, matemáticamente se describe en la Ec.2.2 (Richmond, 2004).

$$2^0 N_0 \rightarrow 2^1 N_0 \rightarrow 2^2 N_0 \rightarrow 2^3 N_0 \rightarrow 2^n N_0 \quad \text{Ec. 2.1}$$

En donde:

$N_0$  = Número inicial de células

$n$  = Número de duplicaciones

El número de duplicaciones ( $n$ ) en un intervalo de tiempo  $t$ , es determinado por la relación  $t/t_d$ . Entonces el número de células ( $N_t$ ) en un cultivo de crecimiento exponencial después de ser incubado por algún tiempo,  $t$  (Richmond, 2004), se puede estimar como:

$$N_t = N_0 2^n = N_0 2^{t/t_d}$$

$$N_t/N_0 = 2^{t/t_d}$$

$$\ln(N_t/N_0) = (\ln 2) t/t_d \quad \text{Ec. 2.2}$$

Durante la fase de crecimiento exponencial, la tasa de crecimiento de las células es proporcional a la biomasa de éstas. Por lo que si se modifica la ecuación Ec.2.3 asumiendo que la concentración de biomasa entre un tiempo inicial 0 y un tiempo  $t$  como  $X_0$  y  $X_t$ , respectivamente tenemos:

$$\ln(X_t/X_0)/t = 0.693/t_d$$

$$d(\ln(X))/dt = 0.693/t_d$$

$$d(\ln X)/dX \cdot dX/dt = 0.693/t_d$$

$$1/X \cdot dX/dt = 0.693/t_d$$

$$\mu = 0.693/t_d \quad \text{Ec. 2.3}$$

En donde  $\mu$  representa la tasa específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ) de un cultivo, el cual define la fracción del incremento de la biomasa por unidad de tiempo.

En la Tabla 2.2 se muestra algunas tasas específicas de crecimiento para ciertas especies.

**Tabla 2.2: Tasas específicas de crecimiento para algunas especies (Lee, 2001).**

| <i>Especie</i>        | <i>Tasa específica de crecimiento máxima (<math>h^{-1}</math>)</i> |                      |                    | <i>Referencia</i>                            |
|-----------------------|--|----------------------|--------------------|--|
|                       | <i>Fotosintético</i>   | <i>Heterotrófico</i> | <i>Mixotrófico</i> |  |
| Chlorella pyrenoidosa | 0.082  | 0.038 (glucosa)      | -                  | (Droop, 1974)                                |
| Chlorella vulgaris    | 0.11   | 0.098 (glucosa)      | 0.198 (glucosa)    | (Ogawa and Aiba, 1981)                       |
|                       | 0.081  | 0.050 (glucosa)      | 0.131 (glucosa)    | (Martinez and Orus, 1991)                    |
| Haematococcus         |  | 0.017 (acetato)      | 0.034 (acetato)    | (Droop, 1955)                                |
| Pluvialis             | 0.013  | 0.009 (acetato)      | 0.024 (acetato)    | (Kobayashi et al., 1992)                     |
| Scenedesmus acutus    | 0.061  | 0.040 (glucosa)      | 0.048 (glucosa)    | (Ogawa and Aiba, 1981)                       |
| Spirulina platensis   | 0.028  | 0.008 (glucosa)      | 0.026 (glucosa)    | (Chen and Johns, 1996; Marquez et al., 1995) |

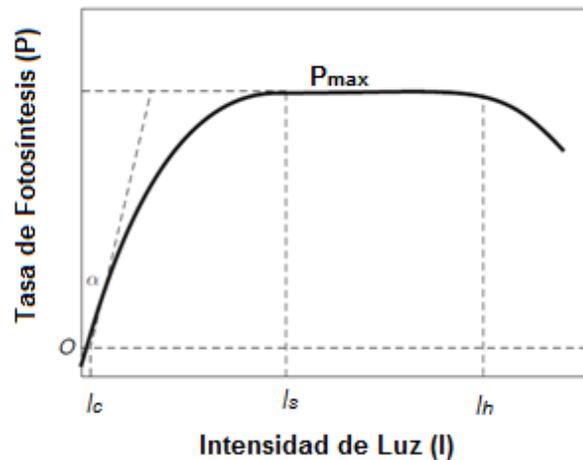
Acetato y glucosa utilizadas como sustrato de carbono

### 2.5.3 Parámetros que influyen en el crecimiento de las algas

Como todo organismo vivo, las condiciones físicas tienen gran influencia en el crecimiento de las microalgas. Cada especie tiene un particular intervalo de temperatura, intensidad de luz, salinidad, pH, nutrientes, dióxido de carbono y oxígeno para la producción de un máximo crecimiento (Romo Piñera, 2002).

#### 2.5.3.1 Luz

La luz es uno de los parámetros que mayor incidencia tiene en el crecimiento y productividad de microalgas, debido a que el crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de la luz recibida, este comportamiento se ve generalizado en la Figura 2.9, en donde se puede observar que a intensidades de luz baja se obtienen bajas tasas de crecimiento (Alcántara et al.); mientras que este se acelera con el aumento de la luz pudiendo llegar a la saturación, alcanzando así la tasa de crecimiento máxima ( $I_s$ ); si se incrementa la intensidad de la luz por encima de este punto ( $I_h$ ) provocará una disminución en la tasa de crecimiento, ocasionando la muerte celular debido a la fotoinhibición. Aunque se han encontrado diversos estudios que sostienen que a altas intensidades de luz la producción de polisacáridos en las células tiende a aumentar (Ruiz Martínez, 2011; Richmond, 2004).



3

**Figura 2.9** Curva intensidad de luz vs Tasa de fotosíntesis (Richmond, 2004)

Las algas son microorganismos que convierten la energía lumínica en metabólica mediante la fotosíntesis, esta energía lumínica puede ser recibida de forma natural en ciclos de día y noche; o artificial, que a su vez puede ser de forma continua o discontinua en ciclos alternados de luz y oscuridad (Romo Piñera, 2002).

### **2.5.3.2** *Agitación*

La agitación asegura la distribución de los gases y de la luz, además esta facilita el transporte de las células, evita la sedimentación y la adherencia de las microalgas en la base o paredes del reactor, así como ayuda a homogenizar el pH. Sin embargo existen especies que no toleran una agitación fuerte debido a que son sensibles al estrés hidrodinámico (Ruiz Martínez, 2011).

### **2.5.3.3** *Temperatura*

La productividad de las algas se acelera cuando la temperatura del medio en el que se encuentran aumenta, aunque lo recomendable sería llegar a una temperatura óptima, ya que por encima de esta, la producción celular disminuye debido al incremento de la respiración y fotorespiración de las algas (Park et al., 2010). El rango de temperaturas en el que las microalgas pueden desarrollarse es muy amplio, además difiere entre las distintas especies, la *Chlorella* por ejemplo puede crecer en un rango de 5 y 42°C (Ruiz Martínez, 2011). Las bajas temperaturas inducen a la acumulación celular de polioles y aminoácidos o derivados de aminoácidos que podrían contribuir a la sensibilidad o tolerancia de microalgas a la refrigeración (Richmond, 2004).

### 2.5.3.4 pH

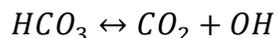
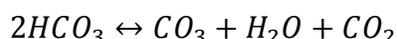
El pH puede afectar muchos de los procesos bioquímicos asociados con el crecimiento y metabolismo de las algas, incluso la disponibilidad de los iones de Nitrógeno como nutrientes. El rango de pH generalmente varía entre 8 y 10, aunque para la producción en masa el pH recomendable está alrededor de 8.2 y 8.7, valores de pH excesivamente bajos o altos disminuyen la productividad (Ruiz Martínez, 2011; Park et al., 2010).

### 2.5.3.5 Nutrientes

#### Carbono

A diferencia de las plantas terrestres, el CO<sub>2</sub> presente en la atmósfera no resulta suficiente para cultivos de producción de alto rendimiento. En los sistemas de tratamiento de agua residual la presencia de CO<sub>2</sub> depende de la oxidación de compuestos orgánicos como las bacterias. Sin embargo el contenido de CO<sub>2</sub> en el agua residual doméstica no es suficiente para una óptima producción de algas. Por lo que la adición de CO<sub>2</sub> es una técnica altamente eficiente, además el control de pH a través de burbujeo directo de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo es el mejor y más conveniente método para control de pH y al mismo tiempo el suministro de CO<sub>2</sub> para cultivos en masa de alto rendimiento (Park et al., 2010; Richmond, 2004).

El bicarbonato o carbonato también es una fuente de carbono, su comportamiento se detalla en la siguiente reacción:



Sin embargo en esta reacción se acumula el radical hidroxilo, lo que provoca un aumento gradual de pH (Richmond, 2004).

#### Nitrógeno

El nitrógeno es el nutriente más importante que contribuye a la producción de biomasa, después del carbono. Además es un factor crítico para la regulación del contenido lipídico celular de las microalgas. Sin embargo en exceso puede disminuir el crecimiento celular (Park et al., 2010).

El contenido de nitrógeno en las células de las microalgas generalmente oscila entre 1-10% de biomasa, puede variar según la especie y de la disponibilidad de este. La fuente nitrógeno puede ser suministrada como nitrato ( $\text{NO}_3$ ), amonio ( $\text{NH}_4$ ) o urea (Richmond, 2004).

## **Fósforo**

El fósforo es esencial para el crecimiento de las algas, así como para varios procesos como la transferencia de energía, biosíntesis de ácidos nucleicos, etc. El contenido de fósforo en las células está alrededor del 1% de la biomasa; además es uno de los factores más importantes para el crecimiento de las algas en biotecnología y puede ser suministrado como orto-fosfato ( $\text{PO}_4$ ). El suministro de fósforo influencia a la composición de la biomasa producida, especialmente en el contenido de lípidos y carbohidratos (Richmond, 2004).

## **2.6 Ensayo de Respirometría**

### **2.6.1 Introducción**

La respirometría consiste en medir e interpretar la tasa de consumo biológico de oxígeno (OUR) bajo condiciones experimentales bien definidas (Janssens, 2010). La técnica se basa en medir el consumo de oxígeno por parte de microorganismos que trabajan sobre un sustrato orgánico, el cual es degradado y oxidado por  $\text{CO}_2$ . Con esta técnica se han encontrado crecientes aplicaciones para la determinación de la cinética de biodegradación. Además, con los ensayos respirométricos se puede adquirir datos sobre el consumo de oxígeno en respuesta al metabolismo de un sustrato por la respiración de microorganismos, así mismo provee puntos de referencia de alta calidad para la valoración de parámetros biocinéticos (Guarín Villamizar et al., 2013).

Los resultados que se obtienen en un ensayo respirométrico depende de las condiciones bajo las cuales se trabaje, por lo que para una correcta interpretación se debe conocer estas condiciones, tales como: concentración, pH, temperatura, DQO, temporalidad de la medida de oxígeno (puntual, continua). Además se puede medir otras variables como:  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$  (Guarín Villamizar et al., 2013).

### **2.6.2 Clasificación**

Según la IWA (*International Water Association*) los respirómetros se clasifican en función de tres parámetros designados por letras (Carmona et al., 2004)

1. La primera letra que se designa depende del medio en donde se realiza la medida de oxígeno, así se otorga la letra G o L si es gas o líquido respectivamente.
2. La segunda letra que se designa indica de qué forma entra el gas al respirómetro, será F si es de forma continua o S si es permanente estático.
3. La tercera letra indica de qué manera entra la fase líquida al respirómetro, así se designará la letra F si es continua o S si es permanente estático.

De esta forma se dan algunas configuraciones que se detallan a continuación.

### **2.6.2.1 Respirómetro continuo**

Esta se basa en medir la tasa de respiración en un recipiente por el cual circula el aire de manera continua. Se mide caudal y concentración de oxígeno en el aire a la entrada y salida de forma permanente para determinar por diferencia el consumo instantáneo de oxígeno. Se trata de un respirómetro GFS, en donde la medida de oxígeno es en un medio gaseoso, la entrada de gas es continua y la entrada del medio líquido permanece estático (Guarín Villamizar et al., 2013).

### **2.6.2.2 Respirómetro discontinuo (Batch)**

En este respirómetro se inyecta aire hasta alcanzar el valor máximo de concentración de oxígeno establecido, una vez alcanzado este punto se deja de suministrar aire y se espera hasta que los microorganismos lo consuman hasta llegar al punto mínimo de concentración, luego de esto se volverá a airear. Se mide el tiempo que los microorganismos emplean para consumir el oxígeno con lo que se obtiene la velocidad instantánea de consumo de oxígeno. Este respirómetro funciona como un GSS o LSS según la medida se haga en gas o líquido respectivamente (Guarín Villamizar et al., 2013).

## **2.7 Microalgas como fuente de biocombustible**

### **2.7.1 Introducción**

Debido al desgaste de las reservas de combustible fósiles, junto con el aumento de la demanda mundial de energía, se ha visto la necesidad de desarrollar nuevas fuentes de energía renovable (Santacesaria et al., 2012). En los últimos años una alternativa altamente fiable ha sido la producción de biodiesel mediante la transesterificación de lípidos extraídos de microalgas, sin embargo las microalgas aún no han sido consideradas como una alternativa disponible en el mercado para la producción de biocombustible (Uggetti et al., 2014).

Las microalgas se reproducen mediante la fotosíntesis, convirtiendo la energía del sol en energía química completando así un ciclo de crecimiento en pocos días. Además las microalgas crecen en cualquier lugar, necesitan únicamente luz solar y algunos nutrientes, sin embargo un cultivo se puede potenciar si se adicionan nutrientes específicos y se controla la aireación (Mata et al., 2010)

La importancia de estudiar estos microorganismos sin duda radica en el potencial uso para la producción de biomasa ya sea para alimento humano o animal, productos químicos o biocombustible utilizando para ello la energía solar (Richmond, 2004).

### **2.7.2 Productividad de microalgas**

Los cultivos de microalgas bajo condiciones controladas, pueden producir una cantidad de aceites por hectárea 20 veces más que la de cultivos oleaginosos como la soja, de esta forma diversas especies de microalgas pueden producir aceites que alcanzan hasta un 35% o más de su peso seco, además la estructura del aceite producido es muy similar al aceite derivado de plantas y vegetales como la soja, la palma y la colza (Kumar et al., 2014).

Las microalgas pueden crecer rápidamente y capturar el CO<sub>2</sub> del medio ambiente para convertirlo en moléculas orgánicas más complejas como lípidos, que pueden ser usados como fuente de energía pudiendo reemplazar totalmente los combustibles fósiles, ya que la productividad de microalgas es extremadamente alta, pudiendo incluso reproducirse más de tres veces en un día. Además en algunas microalgas el contenido de lípidos puede llegar a ser hasta 50%, y bajo condiciones controladas puede exceder el 80% del total de la biomasa (Ríos et al., 2013; Halim et al., 2011). En la Tabla 2.3 se muestra el contenido de lípidos de algunas especies de microalgas obtenidos en investigaciones previas alrededor del mundo.

Tabla 2.3 Contenido de Lípidos de algunas microalgas (Arias Peñaranda et al., 2013)

| Agua dulce / marina    | Microalga                        | Lípidos (% peso seco)  | Referencia   |
|------------------------|----------------------------------|--|--|
| <b>Agua dulce</b>      | <i>Chlorella emersonii</i>       | 63   | Illman, et al., 2000   |
|                        | <i>Chlorella protothecoides</i>  | 11-59  | Illman, et al., 2000; Miao y Wu, 2006; Shen et al., 2009, Shen et al., 2010; Sforza et al., 2012 |
|                        | <i>Chlorella pyrenoidosa</i>     | 27   | Tang et al., 2011a   |
|                        | <i>Chlorella sorokiniana</i>     | 13-23  | Illman, et al., 2000; Zheng et al., 2012   |
|                        | <i>Chlorella saccharophila</i>   | 18-54  | Isleten et al., 2012; Zheng et al., 2012   |
|                        | <i>Chlorella</i> sp.             | 19-43  | Rodolfi et al., 2009; Praveenkumar et al., 2012  |
|                        | <i>Chlorella vulgaris</i>        | 15-58  | Illman et al., 2000; Converti et al., 2009; Widjaja et al., 2009; Yeh, et al., 2012              |
|                        | <i>Chlorella zofingiensis</i>    | 51   | Liu et al., 2011   |
|                        | <i>Haematococcus pluvialis</i>   | 35   | Damiani et al., 2010   |
|                        | <i>Neochloris oleoabundans</i>   | 26-38  | Li et al., 2008; Pruvost et al., 2009; Popovich et al., 2012; Santos et al., 2012                |
|                        | <i>Scenedesmus dimorphus</i>     | 31   | Shen et al., 2009  |
|                        | <i>Scenedesmus incrassatulus</i> | 8-12   | Hernández et al., 2009; Arias et al. 2011b; Castillo Ramírez et al., 2011                        |
|                        | <i>Scenedesmus obliquus</i>      | 10-43  | Mandal y Mallick, 2009; Ho et al., 2010; Tang et al., 2011a                                      |
|                        | <i>Scenedesmus rubescens</i>     | 27-43  | Lin y Lin, 2011; Tan y Lin, 2011; Lin et al., 2012   |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | 7-53                             | Hernández et al., 2009; Rodolfi et al., 2009; Xin et al., 2010a; Xin et al., 2010c |  |
| <b>Agua marina</b>     | <i>Chlorella minutissima</i>     | 57   | Illman, et al., 2000   |
|                        | <i>Chlorella</i> sp.             | 35-52  | Chiu et al., 2008; Hsieh y Wu, 2009  |
|                        | <i>Chlorella vulgaris</i>        | 57   | Liu et al., 2008   |
|                        | <i>Dunaliella tertiolecta</i>    | 24   | Tang et al., 2011b   |
|                        | <i>Nannochloris</i> sp.          | 40   | Takagi et al., 2000  |
|                        | <i>Nannochloropsis oculata</i>   | 8-54   | Chiu et al., 2009; Converti et al., 2009   |
|                        | <i>Nannochloropsis</i> sp.       | 24-60  | Rodolfi et al., 2009; Pal et al., 2011; Moazami et al., 2012                                     |
|                        | <i>Tetraselmis suecica</i>       | 20-54  | Rodolfi et al., 2009; Azma et al., 2011  |

Sin embargo la producción de biocombustible a partir de los cultivos de microalgas presenta grandes exigencias y requerimientos, por lo que esto podría limitar la implementación de los cultivos a gran escala (Park et al., 2010; Chisti, 2007). La disponibilidad de agua rica en nutrientes promueve positivamente el crecimiento de las microalgas, lo que conlleva a tener una vasta fuente de biocombustible en cuanto a la competitividad económica y al impacto ambiental. Debido a esto, es una práctica económicamente viable aprovechar el agua residual en el cultivo de microalgas para la producción de biocombustible (Uggetti et al., 2014).

El uso de microalgas para la producción de biocombustible presenta muchas ventajas comparado con otro tipo de materia prima, sobre todo por la facilidad de cultivar, además reutiliza el agua que no es apta para el consumo humano,

pueden cultivarse en cualquier lugar de las aguas residuales, no requiere ningún terreno fértil para su crecimiento, entre otros (Kumar et al., 2014).

### **2.7.3 Extracción de lípidos**

Las algas pueden acumular lípidos debido al consumo de azúcares a una tasa superior a la tasa de generación de células, lo que promueve la conversión del exceso de azúcar en lípidos; de esta forma varias especies pueden ser inducidas a producir lípidos específicos y ácidos grasos mediante manipulaciones sencillas en las propiedades físicas y químicas del medio de cultivo (Araujo et al., 2013).

El proceso de producción de biocombustible a partir de microalgas consiste en el cultivo de la biomasa, cosecha, secado, y la extracción de lípidos, seguido por la conversión de los lípidos extraídos en biocombustible, y finalmente purificación del biodiesel producido (Taher et al., 2014).

La extracción consiste en una rutina para determinar el contenido de lípidos de las microalgas, debido a que estas son cultivadas en un medio acuoso la biomasa seca típicamente llega a ser entre un 10-30% del cultivo, siendo ésta energía. Sin embargo la desventaja más importante es el alto costo que este proceso representa (Halim et al., 2011). Por lo que es recomendable seleccionar las mejores cepas y las mejores condiciones de cultivo con la finalidad de alcanzar altas tasas de productividad de lípidos que aseguren la calidad del biocombustible (Arias Peñaranda et al., 2013).

Los lípidos son comúnmente solubles en solventes orgánicos como el éter, hexano, cloroformo, etc. pero insoluble en agua. La fracción de grasa de la célula de una microalga consiste en una compleja mezcla de diferentes tipos de moléculas, así por ejemplo los triglicéridos son el componente más grande de las células de las microalgas y de esta depende algunos parámetros importante que influyen en los procesos de producción y cosecha (Ríos et al., 2013).

### **2.7.4 Factores que afectan la calidad de los lípidos de microalgas**

Para la producción de biocombustible a partir de microalgas se deben considerar los factores que influyen en el crecimiento de las mismas, así como parámetros que favorecen la producción de lípidos, ya que tanto el contenido de lípidos como la calidad de ácidos grasos de las microalgas varían no solo entre especie sino además en diferentes condiciones de cultivo. Según Arias Peñaranda et al. (2013) entre los factores que afectan la producción de lípidos tenemos: concentración de nutrientes, calidad y cantidad de luz, temperatura, oxígeno, CO<sub>2</sub>, pH, agitación, cosecha y edad del cultivo, algunos de estos se explican a continuación.

- Concentración de nutrientes: el nitrógeno es principal regulador del crecimiento y acumulación de lípidos, asimismo una baja disponibilidad de nutrientes disminuye el crecimiento celular.
- Calidad y cantidad de luz: la intensidad de luz afecta la acumulación de lípidos, la actividad fotosintética, el contenido de pigmentos y la composición química de la célula de la microalga, por lo que es necesario considerar la intensidad, la calidad espectral y el fotoperiodo de la misma.
- Temperatura: aunque los efectos de los cambios de temperatura sean específicos para cada especie, las variaciones más comunes son: variaciones en la velocidad de crecimiento, el contenido de lípidos y la composición de los ácidos grasos.
- Carbono: la capacidad de asimilar  $\text{CO}_2$  varía con la especie, además en algunas especies altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  podría inhibir el crecimiento celular mientras que otras presentan mayor velocidad de crecimiento y productividad de lípidos.
- Agitación: es necesario agitar los cultivos de microalgas para evitar la sedimentación y asegurar la exposición uniforme de las células a la luz y a los nutrientes, además un mezclado inadecuado puede reducir la productividad de biomasa, puede ocurrir muerte celular y fermentación del cultivo.

## CAPÍTULO 3

### 3 Materiales y Métodos

#### 3.1 Introducción

La biotecnología de algas es una temática que ha venido creciendo en los últimos años, aunque esta no sea nueva, ya que los primeros estudios sobre biotecnología de algas se remontan a la época de la II guerra mundial en Alemania con la finalidad de obtener lípidos y proteínas de los cultivos masivos de microalgas (Cobelas and Gallardo, 1989). Sin embargo en nuestro país es un tema muy reciente, el primer laboratorio de biotecnología con fines energéticos fue establecido en marzo del 2013 en la provincia de Pichincha (ANDES, 2013).

La Universidad de Cuenca a través del proyecto VLIR ha iniciado experimentaciones con microalgas con fines farmacéuticos en la Facultad de Ciencias Químicas mediante en el Proyecto “Plantas Medicinales”. Sin embargo, el aprovechamiento de la biomasa algal con fines energéticos ha sido propuesto a través del proyecto “Caracterización biocinética y potencial energético de microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual” financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC) y el apoyo del proyecto VLIR. Parte fundamental de este proyecto ha sido la implementación de reactores que han sido desarrollados mediante técnicas de cultivo obtenidas en la literatura, con la finalidad de desarrollar métodos eficientes que mejoren las condiciones de crecimiento y adaptación de los cultivos de microalgas a escala laboratorio.

En este capítulo se desarrollan las diferentes técnicas implementadas y materiales utilizados para la puesta en marcha y experimentación de cultivos de microalgas a escala laboratorio; además cada uno de ellos cuenta con una breve descripción de su funcionalidad.

#### 3.2 Diseño experimental para el cultivo y crecimiento de microalgas

En la presente investigación se han utilizado 5 familias de microalgas, todas ellas provenientes del Proyecto VLIR Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca. El mencionado proyecto ha realizado un proceso de aislamiento de familias de microalgas, de las cuales dos de ellas están identificadas, *Chlorella* y *Scenedesmus*. A las tres familias restantes de microalgas se les ha asignado un

nombre genérico con la finalidad de mantenerlas aisladas; estas son: FF. Especie 1, FF. Especie 3 y H1.

### 3.2.1 Materiales y procedimientos usados para la producción de microalgas

La producción masiva de microalgas se realiza bajo condiciones controladas que permiten obtener biomasa de buena calidad para ser utilizada con diferentes propósitos, como la producción de biodiesel.

Para la producción de microalgas se requiere inicialmente de un inóculo con la especie que se desee cultivar, un recipiente adecuado (fotobioreactor) y diferentes medios de cultivo, según los requerimientos de la especie. En el siguiente apartado se detalla cada uno de los materiales y procedimientos utilizados para la producción masiva de microalgas.

#### 3.2.1.1 Materiales para el montaje del cultivo:

##### Inóculo

En esta investigación, los inóculos de microalgas para iniciar un cultivo fueron de 10-14 ml aproximadamente (ver Figura 3.1), de una familia previamente aislada, y para los siguientes cultivos se utiliza como inóculo un porcentaje alrededor de un 20 % del cultivo anterior.



Figura 3.1 Inóculo de microalgas

##### Fotobioreactor

Un fotobioreactor es un sistema de cultivo diseñado para cultivar organismos fotótrofos como células microbianas, algas o plantas, que limita fuertemente el intercambio de gases y contaminantes entre el cultivo y la atmósfera, por lo que la ventaja de utilizar un fotobioreactor para el cultivo de microalgas es que se

minimiza el riesgo de contaminación por microorganismos como protozoos, bacterias y hongos (Richmond, 2004). En la presente investigación se utilizó un fotobioreactor con los siguientes componentes y características

- Un reactor cilíndrico de acrílico transparente y liso de 15 cm de diámetro y 20cm de altura, volumen total de 3.534 litros y volumen útil aproximadamente 3 litros (ver Figura 3.2 a).
- Un sistema de agitación para evitar la sedimentación y homogenizar el cultivo, para esto se utiliza dos tipos de sistemas, el uno consiste de un motor de agitación IKA RW 16 basic de 230V 50/60Hz, con una hélice IKA R 1342 de cuatro hojas de acero inoxidable, con un botón giratorio para regular la velocidad en una escala de 1 a 10 que corresponde a un rango de velocidad de 40 a 1200 revoluciones por minuto (rpm) (ver Figura 3.2 b). El otro sistema consiste en un agitador magnético modelo MS-17B (ver Figura 3.2 c), con un rango de velocidad de 150-2500 rpm y un magneto de 25 mm de longitud y 5 mm de diámetro.
- Un soporte estable para el montaje del sistema de agitación IKA RW 16 basic.
- El reactor se encuentra rodeado de lámparas fluorescentes VOLTECH de 250 V - 60Hz 250W 1 A (ver Figura 3.2 d) con la finalidad de proporcionar al cultivo la fuente de energía lumínica necesaria para el crecimiento.
- Compresor de aire (ver Figura 3.2 e), manguera de diámetro 1/4" y un aireador de material poroso (tipo pecera para reducir el tamaño de las burbujas), que servirá para la inyección de aire al sistema (ver Figura 3.2 f).



a) Bioreactor

b) Sistema de agitación  
IKA RW 16 basicc) Sistema de agitación  
modelo MS-17B

d) Lámparas fluorescentes



e) Compresor de aire



f) Aireador y manguera de 1/4"

Figura 3.2 Materiales usados para la elaboración del fotobioreactor

### Medio de cultivo

Las algas requieren, además de la energía lumínica, nutrientes minerales para su crecimiento, sin embargo debido a que las algas no tienen los mismos requerimientos nutricionales, no todos los medios de cultivo son aptos para cultivar masivamente cualquier especie. Los medios de cultivo contienen principalmente nitrógeno, fósforo, carbono, y otros minerales que en diferentes proporciones suministran una fuente de alimento para las microalgas (Cobelas and Gallardo, 1989).

El medio de cultivo utilizado en esta investigación está conformado por:

- Bicarbonato de Sodio  $\text{NaHCO}_3$  o Carbonato de Sodio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (ver Figura 3.3 a y b respectivamente).
- Abono completo que sirve como fuente de nutrientes, este contiene: 12% de Nitrógeno, 12% Fósforo, 17% de Potasio, 2% de Magnesio y otros micronutrientes (ver Figura 3.3 c).
- Agua destilada.



Figura 3.3 Compuestos para la preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo se usa una balanza de precisión de 0.0001g “Excellence Analytical Balances” modelo XS-204 de METTLER TOLEDO (ver Figura 3.4) para suministrar las cantidades exactas de cada compuesto.



Figura 3.4 Balanza de precisión

### 3.2.1.2 Procedimiento para el montaje del cultivo:

1. En el reactor, se coloca el inóculo con la especie de microalgas que se desea cultivar, aproximadamente un 20% del volumen del reactor.
2. En caso de ser el cultivo inicial, se completa el volumen del reactor con agua destilada; pero cuando se dispone de agua reciclada de cultivos anteriores se puede completar el volumen del reactor con esta solución, ya que esta es rica en nutrientes que pueden ser aprovechados.
3. Utilizando la balanza de precisión se suministra carbonato o bicarbonato de sodio y nutrientes (abono).

4. Alrededor del reactor se colocan lámparas fluorescentes programadas para encenderse y apagarse en períodos de una hora.
5. Se incorpora además el sistema de agitación: para el sistema *IKA RW 16 Basic*, el botón giratorio se ajusta en 2, que corresponde a una velocidad de 170 rpm; la hélice es colocada a 2-3 cm aproximadamente de la base del reactor; mientras que para el agitador magnético modelo MS-17B se coloca en el primer rango de velocidad que corresponde a una velocidad aproximada de 150 rpm.
6. Finalmente con la ayuda de un compresor se adiciona aire al reactor, mediante una manguera que a su vez se conecta a un aireador poroso tipo pecera. En la Figura 3.5 se muestra el fotobioreactor ensamblado con sus diferentes sistemas de agitación.



Figura 3.5 Montaje del cultivo de microalgas

### 3.2.2 Materiales y procedimientos usados para la evaluación de la tasa de crecimiento

Para estimar la productividad del cultivo es necesario medir el crecimiento celular, para lo cual existen varias formas de hacerlo, ya sea midiendo los cambios de turbidez del cultivo, mediante recuento de células, midiendo el peso seco o carbono orgánico total (Richmond, 2004).

Para esta investigación la productividad algal es estimada mayoritariamente mediante el recuento celular; para esto se lleva un seguimiento a través de dos muestras al día, una en la mañana y otra en la tarde, durante el período que dura cada cultivo. Al final de la investigación se realizó también una estimación del

crecimiento de la biomasa mediante un parámetro indirecto que es la turbiedad. Para esto se utilizó el turbidímetro Turb 555 que se muestra en la Figura 3.6.



Figura 3.6 Turbidímetro Turb 555

### ***3.2.2.1 Materiales para la evaluación de la tasa de crecimiento mediante recuento celular:***

- Pipetas volumétricas de 1ml que sirven para toma de muestras con exactitud (Figura 3.7 a).
- Pera de succión que facilita la extracción de la muestra (Figura 3.7 b).
- Matraz aforado de 10 ml para obtener la disolución exacta de 1 en 10 del cultivo (Figura 3.7 c).
- Piseta para suministrar agua destilada a la disolución (Figura 3.7 d).
- Cámara de Neubauer Boeco de 0.1 mm de profundidad que se utiliza para el conteo celular (Figura 3.7 e).
- Cubreobjetos (Figura 3.7 f)
- Microscopio Olympus CH 20 para magnificar el tamaño de las células, lo que hace posible el recuento de estas (Figura 3.7 g).



Figura 3.7 Materiales usados para el recuento celular

### 3.2.2.2 Procedimiento para la evaluación de la tasa de crecimiento mediante recuento celular:

#### Preparación de la muestra:

Con una pipeta volumétrica de 1 ml, se toma una muestra del medio de cultivo de microalgas del bioreactor, previamente agitado debido a que las células tienden a pegarse en las paredes y en el fondo de este (ver Figura 3.8 a). Posteriormente se diluye la muestra con agua destilada en un matraz aforado hasta obtener un volumen de 10 ml, es decir una dilución de 1:10 (ver Figura 3.8 b), con la finalidad de facilitar el recuento celular en la cámara de Neubauer la cual se especifica a continuación.

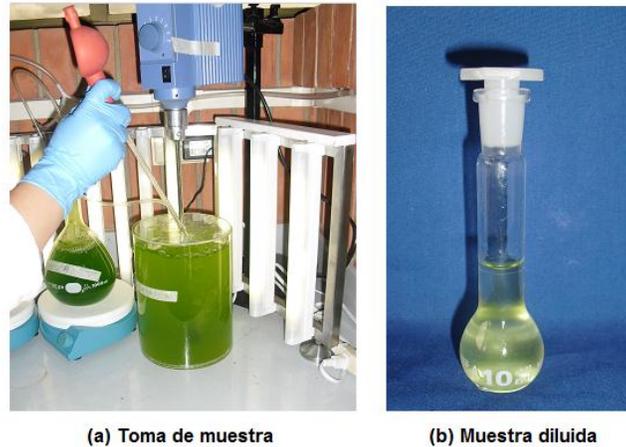


Figura 3.8 Preparación de la muestra

**Cámara de Neubauer:** Presenta dos cámaras las cuales están rodeadas por dos canales longitudinales y un canal transversal central, con el que forman una depresión en forma de H, Figura 3.9 (a), además de dos canales longitudinales externos. En cada cámara está grabado un cuadrado de  $9 \text{ mm}^2$ , que se dividen en 9 cuadrículas de  $1 \text{ mm}^2$  cada una y estas a su vez se encuentran divididas en cuadrículas más finas (Romo Piñera, 2002), como se muestra en la Figura 3.9 (b).

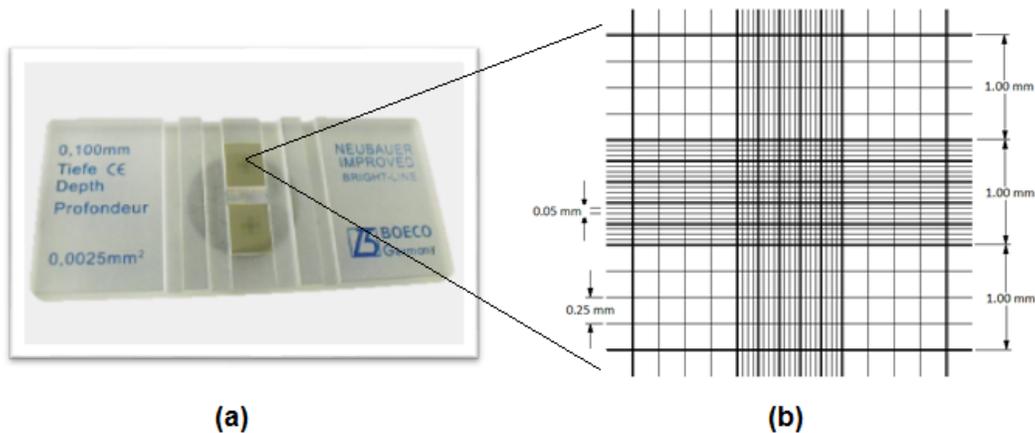


Figura 3.9 Cámara de Neubauer

### Recuento celular

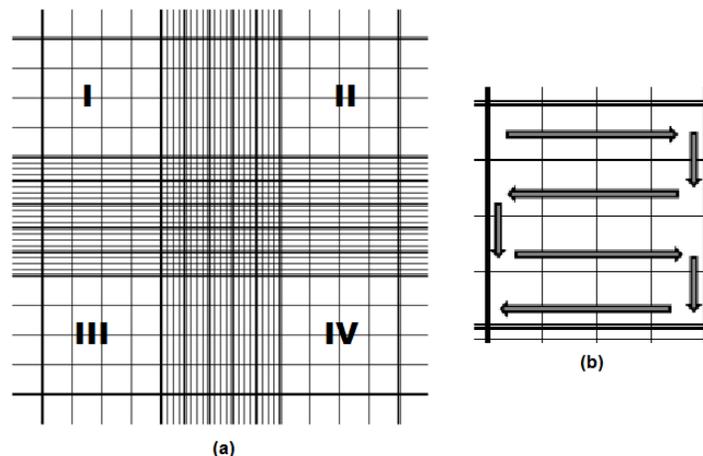
Para realizar el recuento celular en la Cámara de Neubauer, se coloca el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, luego se introduce entre la cámara y el cubreobjetos la muestra de microalgas mediante una pipeta (ver Figura 3.10 a), controlando que no exista aire en el interior y que el cubreobjetos no se deslice sobre la cámara, es decir que no exceda ni falte muestra líquida. Luego se coloca la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio, y se enfoca la muestra

usando el lente magnificador 40x, hasta lograr una imagen nítida de las células (ver Figura 3.10 b).



**Figura 3.10 Recuento celular**

Según la técnica de recuento celular con Hematocitómetro o caja de Neubauer expuestas en Bastidas (2011) se cuentan las células presentes en los cuatro extremos de una de las cámaras de Neubauer, estos son I, II, III, IV, (ver Figura 3.11 a) siguiendo la forma de un zigzag (ver Figura 3.11 b). Por convención si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo de la cuadrícula, las células deben contabilizarse, por el contrario si las células tocan el límite inferior o el límite derecho, estas no deben contabilizarse. Para determinar el número de células presentes en determinada muestra, se hace un promedio de las células contabilizadas en las cuatro cuadrículas.



**Figura 3.11 a) Conteo en cuatro cuadrículas; b) Recuento en zigzag**

Para la determinación de la concentración de células de microalgas presentes en el bioreactor, primero se calcula el volumen de muestra que queda entre el cubreobjetos y una cuadrícula de  $1 \text{ mm}^2$  de sección de la cámara de Neubauer

que tiene profundidad conocida de 0.1 mm. Entonces el volumen de la muestra es  $1 \text{ mm}^2 \cdot 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3$ . Por lo tanto la concentración celular será igual al número promedio de algas contabilizadas por  $0.1 \text{ mm}^3$  de volumen de muestra, a su vez esta concentración se transforma a número de células por mililitro; ya que  $0.1 \text{ mm}^3$  es igual a 1000 ml y la muestra esta diluida en 10 partes, se tiene que el número de células por mililitro será igual a  $\# \text{ de células} \cdot \frac{1000}{0.1} \cdot 10$ .

Con el siguiente ejemplo se ilustra esta transformación: si se contabilizan 120 células en promedio de las cuatro cuadrículas observadas, el número total de individuos por mililitro será:

$$\frac{120 \cdot 1000}{0.1} \cdot 10 = 12000000 \text{ células/ml}$$

### Análisis de tasas de crecimiento

A partir de los análisis de los recuentos celulares se obtienen las tasas de crecimiento en cada fase del cultivo, estas son analizadas por los siguientes criterios:

- Según Richmond (2004) la tasa de crecimiento se obtiene como:

$$\mu = \frac{0.693}{t_d} \quad \text{Ec. 3.1}$$

En donde:

$\mu = \text{tasa de crecimiento (h}^{-1}\text{)}$

$t_d = \text{tiempo de duplicación (h)}$

- Según Piña et al. (2007)

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{C_{t+1}}{C_t}\right)}{\ln 2} \quad \text{Ec. 3.2}$$

En donde:

$\mu = \text{tasa de crecimiento}$

$C_{t+1} = \text{concentración celular en el tiempo } t + 1$

$C_t = \text{concentración celular en el tiempo } t$

- Según Kitaya et al. (2008)

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Ec. 3.3}$$

En donde:

$\mu$  = tasa de crecimiento

$N_1$  = número de células en el tiempo  $t_1$

$N_2$  = número de células en el tiempo  $t_2$

### 3.2.2.3 Procedimiento para la evaluación análisis de crecimiento mediante turbiedad:

- Con una pipeta volumétrica de 25 ml se toma una muestra del cultivo (Figura 3.12 a) y se coloca en la cubeta.
- Se agita la muestra y se verifica que la cubeta este completamente limpia, seca y libre de manchas (Figura 3.12 b).
- Se coloca la muestra en el turbidímetro y finalmente se registra el valor medido (Figura 3.12 c).



Figura 3.12 Procedimiento para análisis de Turbiedad

## 3.2.3 Materiales y procedimientos para la obtención de biomasa algal

### 3.2.3.1 Materiales

#### Cosecha

Para el aprovechamiento de la biomasa algal, es necesario separarla del medio de cultivo, para lo que en este estudio se usan técnicas como sedimentación, centrifugación y filtración. Para efectuar dichas técnicas se emplean los siguientes materiales:

- Matraces para el almacenamiento y disposición de los cultivos (Figura 3.13 a).
- Mangueras de un 1/4" para separar el sobrenadante del cultivo sedimentado (Figura 3.13 b).
- Centrífuga Thermo Scientific Heraeus Megafuge 8 para acelerar la sedimentación para la separación de la biomasa (Figura 3.13 c).



(a) Matraz

(b) Manguera de 1/4"

(c) Centrífuga

**Figura 3.13 Materiales empleados para la cosecha de microalgas**

### Deshidratación de microalgas

Después de la cosecha de la biomasa algal, lo óptimo es deshidratar la biomasa inmediatamente, para evitar que esta se descomponga, para lo cual, en esta investigación se usa la técnica de filtración, posteriormente se termina de deshidratar la biomasa filtrada mediante secado al horno y finalmente se tritura la biomasa desecada. Para lo que se requiere de:

- Filtros de microfibras de vidrio o Filtros de papel Whatman de 110 mm de diámetro (Figura 3.14 a).
- Bomba de succión para la filtración de la biomasa (Figura 3.14 b).
- Filtro de porcelana (Figura 3.14 b)
- Horno para desecar la biomasa (Figura 3.14 c).
- Morteros para triturar la biomasa desecada (Figura 3.14 d).
- Cajas Petri para almacenar la biomasa triturada hasta la posterior extracción de lípidos (Figura 3.14 e).



a) Filtro

b) Bomba de succión y  
Filtro de porcelana

c) Horno



d) Morteros



e) Caja Petri

Figura 3.14 Materiales usados para la deshidratación de la biomasa

### 3.2.3.2 Procedimiento:

#### Cosecha de microalgas:

El tiempo óptimo para la cosecha de microalgas, es cuando el crecimiento de estas ha llegado al final de la fase exponencial y está comenzando la fase lineal, en este punto se encuentra el mayor número de células, lo que resulta favorable para obtener la mayor cantidad de biomasa.

Para la cosecha de microalgas se realiza el siguiente procedimiento:

1. Se retira el sistema de agitación y aireación del bioreactor como se muestra en (Figura 3.15 a).
2. Se recolecta en matraces parte del cultivo, aproximadamente un 80%, en un refrigerador para posteriormente separar la biomasa (Figura 3.15 b).
3. El resto del cultivo, alrededor del 20% se reutiliza para la siguiente siembra como inóculo (Figura 3.15 c).



Figura 3.15 Procedimiento para la cosecha de microalgas

### Separación y deshidratación de microalgas:

1. El cultivo recolectado en matraces es centrifugado inmediatamente, con la finalidad de obtener biomasa con la menor cantidad de agua, para ello se utiliza ciclos de 5 minutos a 4000 rpm (ver Figura 3.16 a). Se debe tener precaución para colocar las muestras en el rotor de la centrifuga, verificando que estas queden equilibradas para obtener una operación segura como se observa en la Figura 3.16 (b).

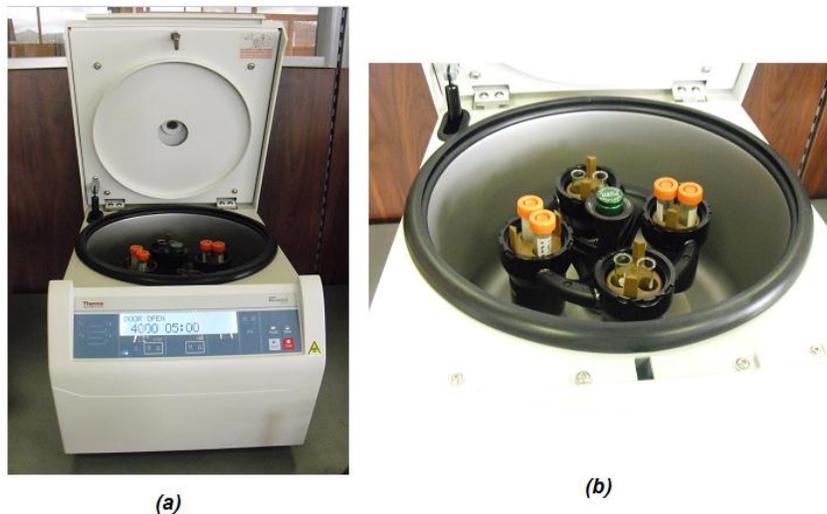


Figura 3.16 a) Separación de microalgas mediante centrifugación; b) Colocación segura de muestras en el rotor

Para la deshidratación de las microalgas se procede de dos maneras, la primera es mediante filtración y secado al horno y la segunda es mediante liofilización, estos procedimientos son explicados a continuación:

### **Filtración y secado al horno**

1. Se filtra la parte sedimentada (Figura 3.17 a), para ello se coloca el filtro de microfibra de vidrio dentro del filtro de porcelana, este es mojado con la piseta con agua destilada para que se adhiera al filtro de porcelana y se acciona la bomba para succionar el exceso de agua (Figura 3.17 b).
2. La biomasa filtrada es retirada cuidadosamente del filtro (Figura 3.17 c) y es desecada en un horno a 37°C durante 4 horas (Figura 3.17 d).
3. Finalmente se tritura la biomasa desecada con la ayuda de un mortero hasta convertirla en polvo (Figura 3.17 e).



**Figura 3.17 Procedimiento de filtración y secado de la biomasa algal**

### **Liofilización**

La técnica de liofilización se usa para deshidratar la biomasa con la finalidad de obtener biomasa algal seca y además conservar composición bioquímica de esta, ésta técnica produce la rotura de las células para facilitar los procedimientos posteriores (Richmond, 2004); esta consiste en tres fases:

1. Congelación para solidificar la muestra, aproximadamente a -80°C por lo menos durante dos horas.
2. Secado primario por sublimación para reducir la humedad.
3. Secado secundario para reducir la humedad restante.

Este proceso dura alrededor de 24 horas y es realizado en el laboratorio del Proyecto “Plantas Medicinales”, en la facultad de Química de la Universidad de Cuenca. Para este procedimiento se usa un Liofilizador LABCONCO FreeZone de 2.5 litros con una plataforma de 12 puertos en la Figura 3.18 se observa el equipo mencionado y la muestra obtenida.



Figura 3.18 Liofilizador

### 3.3 Configuración de un respirómetro a escala laboratorio

Para explicar la configuración de un respirómetro a escala laboratorio, tanto el diseño como sus aspectos operacionales, este se divide en tres partes: el respirómetro propiamente dicho, el acondicionamiento de señales y el computador, estos se detallan a continuación:

- **Respirómetro:** constituye la parte física donde se lleva a cabo las reacciones biológicas producidas por microorganismos, consta de un reactor de volumen conocido, que recibe agitación y aireación continua, está clasificado como un respirómetro GFS en donde la medida de oxígeno se la hace en fase gas, la aireación es continua y el medio líquido permanece constante (Figura 3.19 a). A través del sensor tipo InPro 6870i de Mettler Toledo se mide oxígeno disuelto, temperatura y presión (Figura 3.19 b). El pH es medido con un pH-metro YSI MultiLab IDS 4010-2 (Figura 3.20 a) a través de un electrodo YSI 4110 (Figura 3.20 b). El respirómetro recibe luz a través de lámparas fluorescentes que son controladas mediante

un relé (Figura 3.19 e) para que se enciendan y apaguen en los períodos requeridos, este relé es controlado por el programa LabVIEW. La luminosidad es medida a través de un luxómetro digital SPER SCIENTIFIC LTD (Figura 3.20 c).



a) Respirómetro



b) Sensor de Oxígeno, Temperatura y Presión



c) Relé

Figura 3.19 Respirómetro



a) pH-metro YSI MultiLab IDS 4010-2



b) Sensor de pH



c) Luxómetro

Figura 3.20 pH-metro y Luxómetro

- **Acondicionamiento de señales:** las señales que emite el sensor de InPro 6870i son acondicionadas a través de un transmisor M400 de Mettler Toledo, y luego envía la señal acondicionada a una tarjeta de adquisición de datos.



Figura 3.21 Transmisor M400 para acondicionamiento de señales

- **Computador:** es la parte en la que se almacenan, procesan y visualizan las señales adquiridas por la tarjeta de adquisición de datos, así como los datos ingresados manualmente, a través del software LabVIEW. En este proyecto se usa una tarjeta de adquisición de datos de National Instrument NI USB-6341 (NI-DAQ).

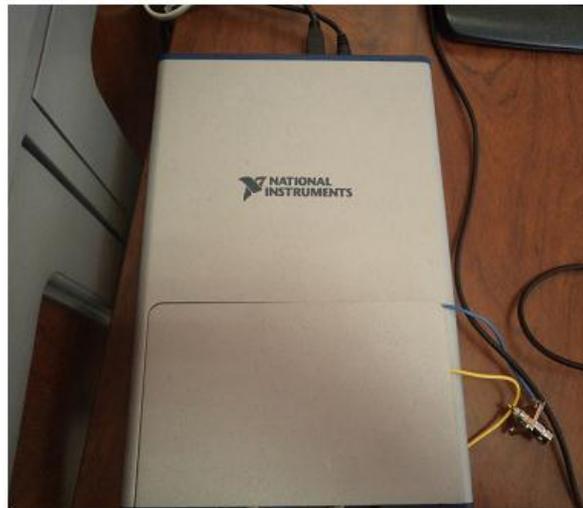


Figura 3.22 Tarjeta de adquisición de datos

### 3.3.1 Automatización del Respirómetro

La automatización del respirómetro tiene como finalidad coordinar procesos que se repiten periódicamente sin la necesidad de un operador, así se garantiza que los experimentos respirométricos se efectúen bajo las mismas condiciones operacionales. Dicha automatización se la realiza mediante el software LabVIEW (*Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench*); este fue creado por la empresa National Instruments en 1976, emplea la programación gráfica o lenguaje G para crear programas basados en diagramas de bloques. Este

software se basa en Instrumentos Virtuales (VI), todo VI tiene una interfaz gráfica (*front panel*) y un diagrama de bloques o código (*block diagram*).

**Interfaz gráfica o panel frontal:** En esta interfaz se encuentra todo lo necesario para controlar un sistema, recoge las entradas procedentes del usuario y representa las salidas proporcionadas por el programa.

**Diagrama de bloques:** es donde se configura el código del programa, es allí donde el programador accede para modificar o mantener un programa.

### **3.3.1.1 Diseño y desarrollo del programa para automatización del respirómetro**

El software LabVIEW es usado para la adquisición de datos, automatización y control del respirómetro. En la presente sección se describe como se realizan dichas acciones.

El programa para la automatización del respirómetro se encuentra dividido en las siguientes secciones: adquisición y almacenamiento de datos de oxígeno disuelto, temperatura, presión y control de la irradiación.

- **Adquisición de datos a partir de NI-DAQ (OD, Temperatura y Presión):** el software NI-DAQ para la adquisición de datos debe estar previamente instalado en el computador. Luego dentro del diagrama de bloque se crea un VI para la adquisición de datos, este cuenta con una función DAQ Assistant para configurar las señales registradas por el transmisor, posteriormente estas son tratadas para ser visualizadas.

La secuencia del programa para la adquisición y control de datos se muestra en Figura 3.23, consta de un “*while loop*”, que sirve para que se repita una acción hasta que manualmente esta sea parada. Los valores registrados por el sensor InPro6870i son visualizados en el monitor a través de indicadores numéricos y finalmente configurados para que sean almacenados en un archivo TDMS, el intervalo de almacenamiento de los datos es configurados para que se ingrese manualmente según lo requerido por el usuario.

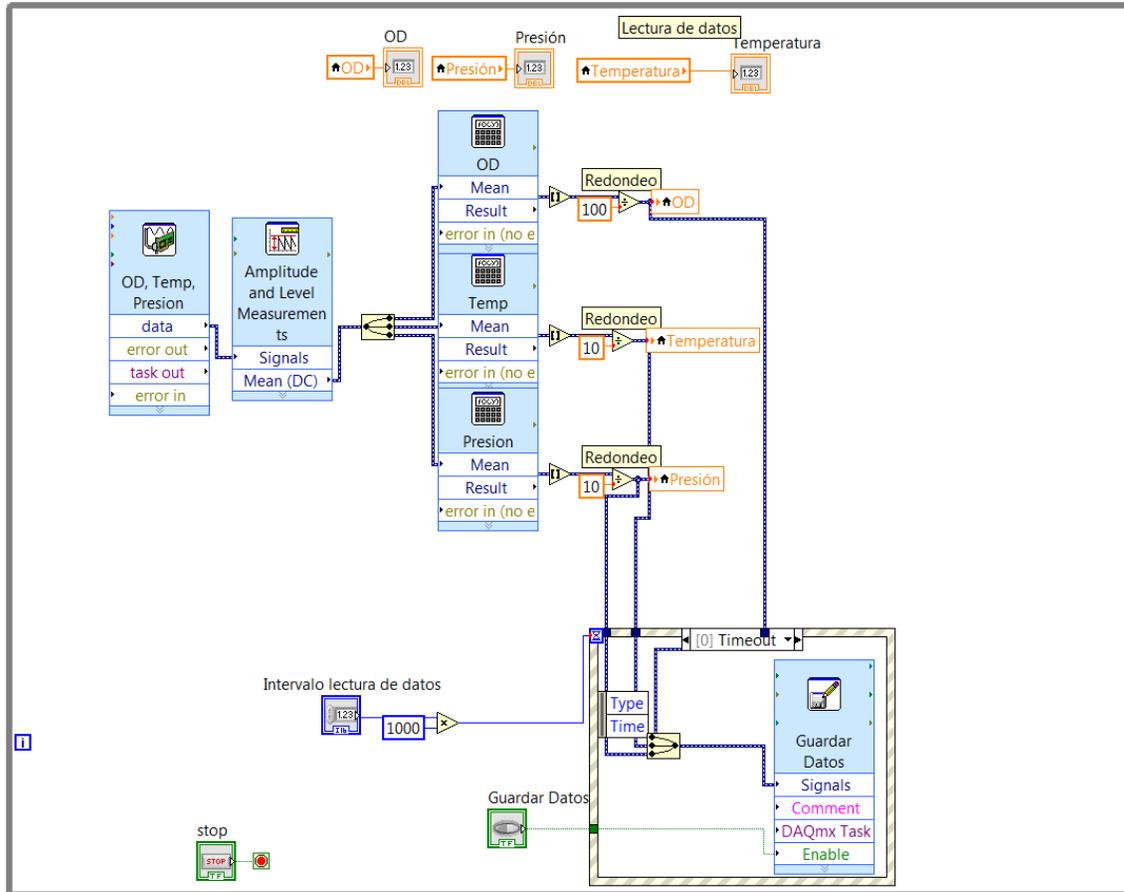


Figura 3.23 Adquisición de datos

- Control de la irradiación:** la irradiación que reciben los reactores está configurada para que sea de forma manual o automática en intervalos de tiempo de encendido o apagado, a través de un “*event structure*” (ver Figura 3.24). Esta señal es enviada a la tarjeta de adquisición de datos, esta a su vez la envía a un relé que controla las lámparas fluorescentes. Esta secuencia también es controlada por un “*while loop*” para que se repita las veces que requiera el usuario.

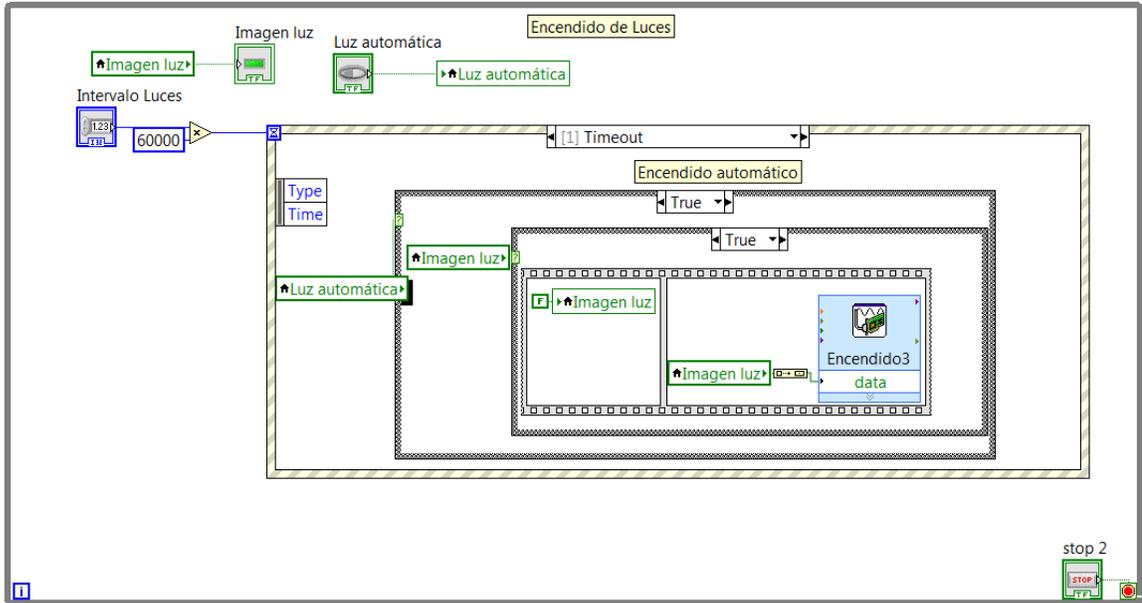


Figura 3.24 Control de irradiación

- **Control de hora y fecha:** la hora y fecha de los registros también es almacenada en el archivo TDMS, a través de un “Get Date/Time String” y se visualiza en el monitor, este subprograma se muestra en la Figura 3.25.

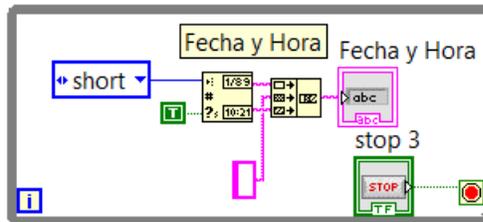


Figura 3.25 Control de hora y fecha

En la figura se muestra el programa desarrollado en LabVIEW para la adquisición de datos y el control de la irradiación que reciben los cultivos de microalgas.

### 3.4 Metodología y protocolos de experimentación con microalgas

En este estudio, con la finalidad de experimentar con microalgas, se establece una línea base para la obtención de lípidos a partir de biomasa, utilizando para ello el método de extracción Soxhlet. En las siguientes secciones se especifica los materiales y los procedimientos que se usan para efectuar este ensayo.

### 3.4.1 Materiales y procedimientos usados para la extracción de lípidos mediante el método Soxhlet

El método de extracción Soxhlet consiste en separar los lípidos de una sustancia, en este caso sólida, a través de un solvente. El equipo Soxhlet está configurado por:

- Un cuerpo condensador que tiene una entrada y salida de agua en la parte inferior y superior del cuerpo respectivamente para producir la condensación del solvente.
- Un cuerpo extractor en donde se coloca la muestra seca, este posee un sifón por el cual pasa el solvente líquido extrayendo los lípidos de la muestra
- Un matraz de destilación donde se acumula el solvente y los lípidos extraídos.
- Una fuente de calor para dar temperatura al solvente hasta que este llegue al punto de ebullición

En la Figura 3.26 se muestra la configuración convencional de este equipo.

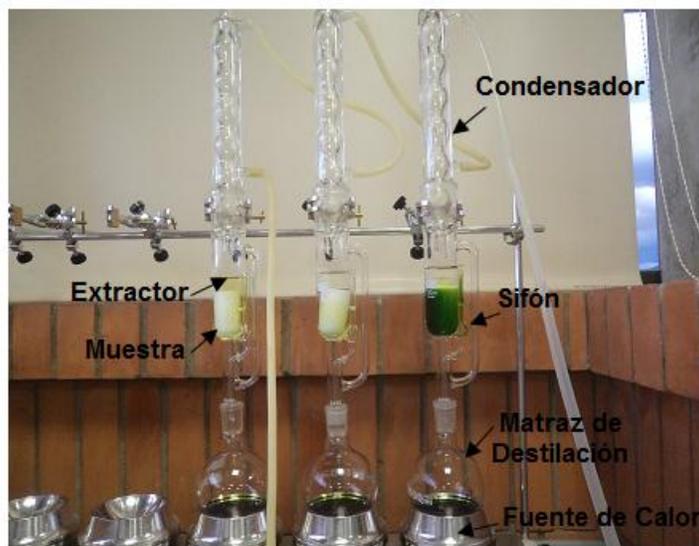


Figura 3.26 Configuración convencional de un extractor Soxhlet

#### 3.4.1.1 Materiales

- Muestra seca de algas trituradas o liofilizadas (Figura 3.27 a).
- Algodón para cubrir la muestra dentro del cartucho de extracción, con la finalidad de que esta no se disperse cuando se coloque el solvente (Figura 3.27 b).

- Cartuchos de extracción Thimble Filters Advantec de 25mm de diámetro por 60mm de altura, para colocar la muestra seca de algas (Figura 3.27 c).
- Balanza de precisión de 0.0001g “Excellence Analytical Balances” modelo XS-204 de METTLER TOLEDO para determinar los pesos necesarios para cuantificar el porcentaje de lípidos extraídos (Figura 3.27 d).
- Equipo Soxhlet P-Selecta Uniplac de placas circulares 6002316 para efectuar la extracción de lípidos (Figura 3.27 e).
- Baño termostático para la recirculación de agua dentro del condensador del Soxhlet con la finalidad de no desperdiciar agua si se utiliza agua corriente y controlar la temperatura (Figura 3.27 f).
- Solventes: Metanol, Cloroformo, Acetona, Hexano (Figura 3.27 g)
- Embudo para añadir los solventes al cuerpo extractor (Figura 3.27 h).
- Estufa y desecador para obtener peso constante del matraz de destilación antes y después de la extracción.



Figura 3.27 Materiales usados para la extracción de lípidos

### 3.4.1.2 Procedimientos

1. Se coloca el matraz de destilación en la estufa durante 1 hora para obtener el peso constante del matraz. Después es colocado dentro de un desecador durante 30 minutos para que se enfríe y luego se obtiene el peso del matraz.
2. En la balanza de precisión se pesa y tara el cartucho de extracción, se coloca la muestra seca dentro del mismo y se pesa (ver Figura 3.28 a),

- luego se tapa con algodón el cartucho con las algas para evitar que la muestra salpique cuando se coloque los solventes.
3. Se prepara el volumen de solvente a utilizar, teniendo en cuenta que sea suficiente para alcanzar dos sifonamientos en el extractor del Soxhlet (un sifonamiento es un ciclo completo de extracción durante el procedimiento experimental), aproximadamente 150 ml. Para la preparación del solvente se debe proceder con cuidado ya que estos compuestos químicos, son tóxicos y pueden ser absorbidos por vía inhalatoria, oral y dérmica (ver Figura 3.28 b).
  4. Se conecta el baño termostático a la entrada y salida del condensador del equipo Soxhlet. Se ajusta la temperatura de 12 a 15°C para mantener frío el condensador y que se produzca una condensación satisfactoria de los solventes.
  5. Se coloca el cartucho con la muestra seca debidamente tapada con algodón en el cuerpo extractor del Soxhlet, y este a su vez se conecta con el matraz de destilación. Con la ayuda de un embudo de vidrio se vierte la mezcla de solventes sobre el cartucho en el cuerpo extractor (ver Figura 3.28 c).
  6. Se acopla el extractor y el matraz al condensador.
  7. Una vez ensamblado el equipo (ver Figura 3.28 d), se conecta la fuente de calor y se ajusta a la temperatura de ebullición de los solventes (ver Tabla 3.1). En caso de ser una mezcla se utiliza la mayor temperatura de ebullición de los solventes utilizados.

**Tabla 3.1 Solventes usados para la extracción Soxhlet en orden de ascendente según el índice de polaridad (Ramluckan et al., 2014)**

| Solvente   | Punto de Ebullición (°C) | Índice de polaridad | Densidad 25°C (g/mL) |
|------------|--------------------------|---------------------|----------------------|
| Hexano     | 69                       | 0.1                 | 0.659                |
| Cloroformo | 60.5-61.5                | 4.1                 | 1.492                |
| Metanol    | 64.7                     | 5.1                 | 0.792                |
| Acetona    | 56                       | 5.1                 | 0.791                |
| Etanol     | 78                       | 5.2                 | 0.789                |



**Figura 3.28 Montaje para la extracción Soxhlet**

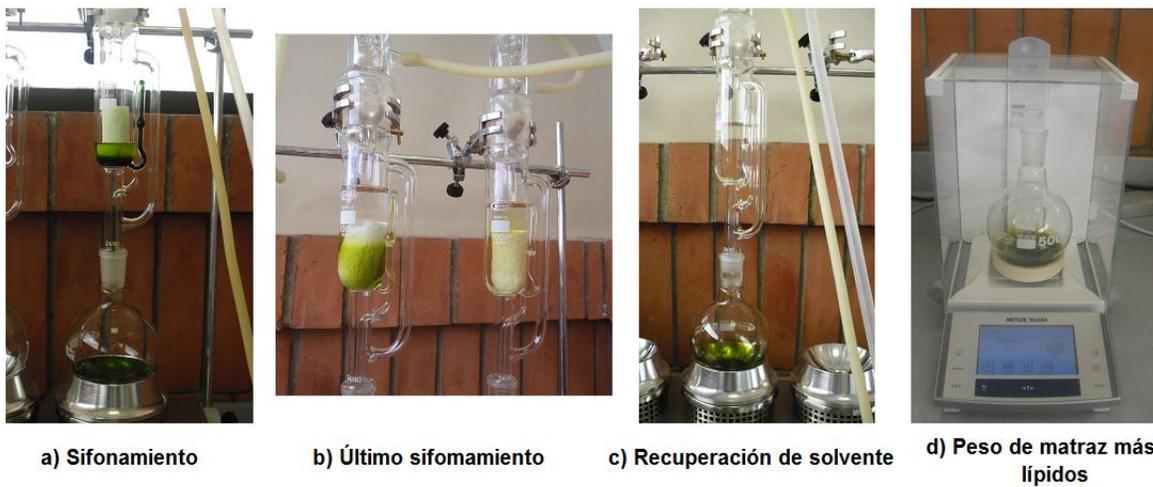
8. Los lípidos son obtenidos mediante la extracción sucesiva por la recirculación del solvente (ver Figura 3.29 a), la cual se repite hasta que se aprecie el color original del solvente (transparente) como se muestra en Figura 3.29 b.
9. Una vez realizado el último sifonamiento, se retira el matraz y el extractor, luego se retira el cartucho del extractor y se vierte el resto del solvente en el matraz.
10. Se acopla nuevamente el matraz y el extractor al condensador para recuperar la mayor cantidad de solvente mediante destilación (Figura 3.29 c), cuidando que el aceite del matraz no se queme.
11. Se almacena el solvente recuperado en un envase hermético y lejos de la luz para que no se evapore debido a su volatilidad.
12. Se deja secar el matraz de destilación en una estufa durante 1 hora a 103°C para evaporar el resto de solvente, luego se coloca el matraz en un desecador por 30 minutos para que se enfríe.
13. Se pesa el matraz seco para calcular por diferencia la cantidad de lípidos obtenidos (Figura 3.29 d).
14. Finalmente el porcentaje de lípidos es obtenido mediante la Ec. 3.4

$$\% \text{ lípidos} = \frac{P_f - P_o}{\text{peso muestra seca}} * 100 \quad \text{Ec. 3.4}$$

En donde:

$P_o$  = *Peso del matraz de destilación vacío*

$P_f$  = Peso del matraz de destilación más lípidos extraídos



**Figura 3.29 Extracción de lípidos mediante método Soxhlet**

## CAPÍTULO 4

### 4 Resultados y discusión

#### 4.1 Introducción

En las siguientes secciones se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de respirometría así como los protocolos de experimentación, análisis del crecimiento de las microalgas a escala laboratorio y finalmente los resultados obtenidos de la extracción de lípidos mediante el método Soxhlet.

Se implementaron cultivos de microalgas de 5 diferentes familias, *Chlorella*, *Scenedesmus*, FF. Especie 1, FF. Especie 3 y H1. Para los experimentos de configuración del respirómetro a escala laboratorio, el aprovechamiento de los lípidos y para la obtención de tasas de crecimiento, se utilizó microalgas de la familia *Chlorella*. Esta fue seleccionada por su capacidad de adaptación a los medios de cultivo y por su capacidad de producir lípidos. Según el estudio de Bermúdez (2012) la familia de microalgas *Chlorella* puede producir hasta 4.1 veces la productividad de aceite de palma africana con una producción de 18.7 mg/l/día de lípidos. Además se hicieron extracciones de lípidos de las familias *Scenedesmus* y FF. Especie 3.

#### 4.2 Caracterización de las especies de microalgas estudiadas

Las familias de microalgas estudiadas en este proyecto se muestran en la Figura 4.1. Son de agua dulce y no poseen flagelos. Las familias a y b son identificadas como *Chlorella* y *Scenedesmus* respectivamente, y las familias c, d y e no están identificadas por lo que se les han asignado nombres genéricos como H1, FF. Especie 1 y FF. Especie 3; sin embargo, estas dos últimas familias, de acuerdo al proyecto “Plantas Medicinales” de la Universidad de Cuenca se clasifican como cyanobacterias.

***Chlorella***: esta familia proviene de las lagunas de maduración de la PTAR de Ucubamba de la ciudad de Cuenca, físicamente se las puede apreciar de forma esférica, se puede diferenciar un núcleo de color rojizo y una membrana claramente definida. Se adaptan rápidamente al medio de cultivo implementado, al mismo tiempo se multiplican rápidamente por lo que exhiben tasas de crecimiento muy altas en comparación con otras especies y familias, además en diferentes investigaciones se ha encontrado que su contenido de lípidos es alto.

**Scenedesmus:** esta familia proviene de las lagunas de maduración de la PTAR de Ucubamba de la ciudad de Cuenca. Estas microalgas en su fase inicial son unicelulares, en forma de pequeñas esferas que al ir creciendo se transforman en colonias que tiene la forma de media luna que poseen en su interior pequeñas esferas que nuevamente se desarrollaran en forma unicelular para luego formar colonias. Estas microalgas además presentan fácil sedimentabilidad, son de fácil adaptabilidad al medio de cultivo y son predominantes ante a ciertas familias como la H1, FF. Especie 1 y FF. Especie 3.

**H1:** esta familia proviene de las lagunas del Parque Nacional Cajas, Ecuador. Crece en colonias en las que generalmente se diferencian cinco células encerradas por aparentemente una membrana, son de forma esférica de mayor tamaño que la familia Chlorella, no se diferencia claramente el núcleo. Esta familia se tarda más en adaptarse al medio de cultivo en comparación con las otras familias estudiadas, pero una vez adaptada crece rápidamente. Tienen además un alto contenido de humedad por lo que presenta baja sedimentabilidad.

**FF. Especie 1:** esta familia proviene del sector de la Josefina, en el río Paute en la provincia del Azuay, está conformada por filamentos en los cuales se observan pequeñas divisiones transversales, están identificadas como cyanobacterias.

**FF. Especie 3:** esta familia proviene del mismo sector que la familia FF. Especie 1. Tienen forma esférica, núcleo de color verdoso y la membrana bien definida, esta familia es de fácil adaptación al medio de cultivo y se reproducen rápidamente. Esta familia también es identificada como cyanobacterias.

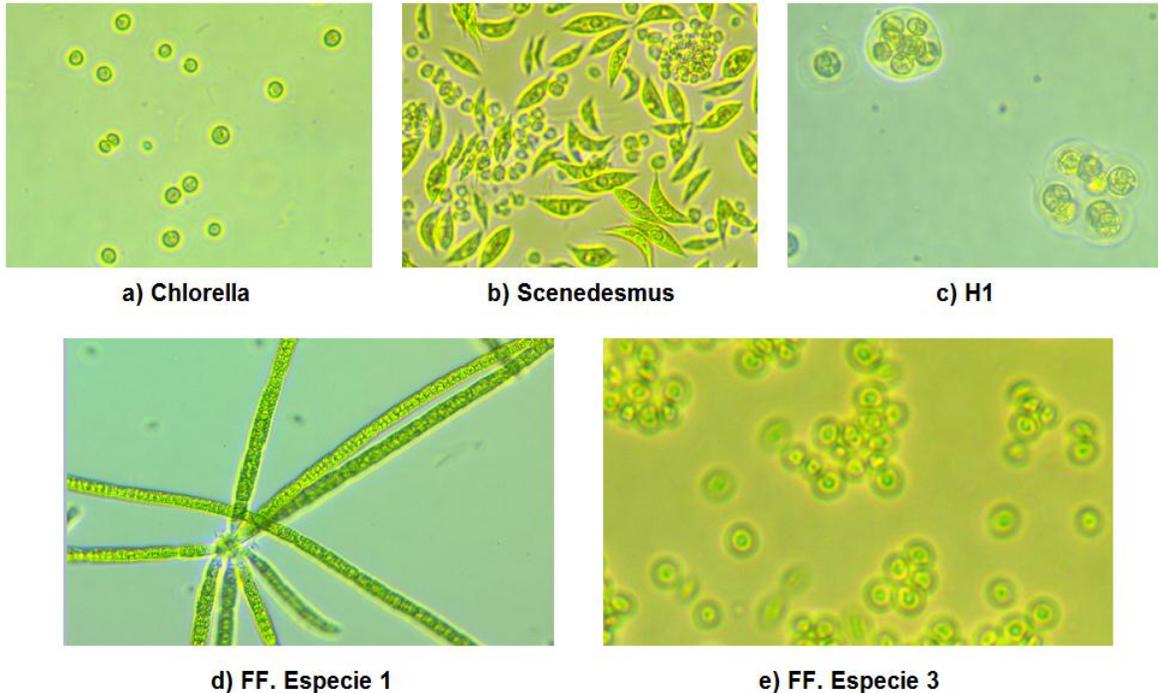


Figura 4.1 Especies de microalgas cultivadas a escala laboratorio<sup>1</sup>

### 4.3 Condiciones para el crecimiento de microalgas

Entre los factores que limitan el crecimiento y productividad de las microalgas tenemos: suministro de nutrientes, pH, temperatura, aireación, agitación, irradiación; por lo que el cultivo de microalgas en fotobioreactores cerrados permite controlar todos estos factores.

El suministro de alimento fue probado en diferentes combinaciones, así el rango de bicarbonato está entre 0.03 - 0.07 g/l y el rango de nutrientes esta entre 0.05 - 0.11 g/L, generando la mayor tasa de crecimiento en fase exponencial la relación de bicarbonato = 0.07 g/l y nutrientes = 0.10 g/l (ver Tabla 4.1).

La condición de iluminación artificial se realizó mediante lámparas fluorescentes como se muestra en la Figura 4.9. Se programó para una fluctuación de la iluminación durante un día, permaneciendo la condición de prendido y apagado por intervalos de una hora durante toda la experimentación. La irradiación correspondiente al periodo de encendido que reciben los reactores es una irradiación promedio de 12157 Lx, mientras que cuando las lámparas están apagadas reciben una irradiación aproximada de 110 Lx durante el día.

<sup>1</sup> Foto tomada en el Laboratorio de Sanitaria de la Universidad de Cuenca mediante un microscopio invertido Nikon T1-SM

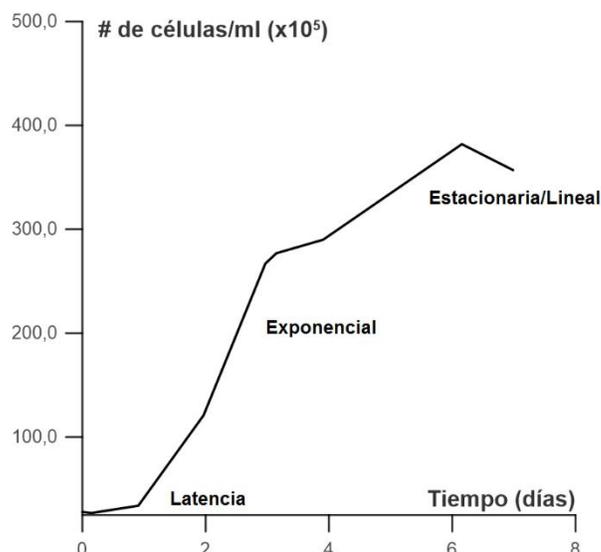
La agitación y aireación que reciben los fotobiorreactores permanece constante durante toda la experimentación, correspondiendo a la agitación un valor aproximadamente de 170 rpm.

La temperatura durante la experimentación no recibió ninguna fuente externa, por lo que las temperaturas reportadas corresponden a las condiciones ambientales normales en el laboratorio con una mínima influencia de las fuentes de iluminación, equipos electrónicos y los procesos biocinéticos que generan los microorganismos. La temperatura se mantuvo durante todos los experimentos entre los valores de 15.6 - 24.9 °C.

El pH fue monitoreado constantemente para evitar condiciones limitantes en este sentido. Inicialmente se realizó medidas diarias simples con sensores manuales y posteriormente se incorporó al pH dentro del sistema de adquisición de datos en forma automática. Los valores se obtuvieron entonces en intervalos de un dato cada 30 segundos, reportándose un rango entre 6.4 a 10.4. El valor inferior corresponde al inicio del cultivo, ascendiendo en el transcurso de este debido a que las microalgas consumen los carbonatos suministrados como nutrientes en el medio de cultivo.

#### **4.4 Obtención de parámetros biocinéticos de microalgas**

A partir del análisis de los recuentos celulares realizados en la familia *Chlorella* durante catorce cultivos en lote (*batch*), se obtienen las diferentes tasas de crecimiento para cada fase desarrollada en cada cultivo, teniendo así que la fase de latencia se desarrolla en aproximadamente 20 horas con una densidad celular promedio de  $53 \times 10^5$  células/ml, la fase de crecimiento exponencial se desarrolla durante aproximadamente 129 horas y alcanza una densidad celular promedio de  $361 \times 10^5$  células/ml y una densidad celular máxima de  $473 \times 10^5$  células/ml. Finalmente en la fase de latencia o de muerte se observa una densidad celular promedio de  $250 \times 10^5$  células/ml, en esta fase el cultivo llega a su final. Además se observa un tiempo de duplicación celular promedio de 23 horas. En la Figura 4.2 se muestra una curva típica del crecimiento de la familia *Chlorella*, en la cual se identifica cada una de las fases de crecimiento.



**Figura 4.2** Curva de crecimiento de un cultivo de la familia Chlorella

En la Figura 4.2 no se observa la fase de latencia o muerte luego de la fase estacionaria debido a que el objetivo era iniciar un nuevo cultivo en la fase de mayor producción para la obtención de la mayor cantidad de biomasa posible.

Las tasas de crecimiento se obtuvieron usando tres distintos criterios, el primero es el de Richmond (2004), este aplica en su formulación el tiempo de duplicación por lo que se aplica únicamente para la fase de crecimiento exponencial; el criterio de Piña et al. (2007) y Kitaya et al. (2008) se usan en las tres fases de crecimiento analizadas en esta investigación. Las tasas de crecimiento obtenidas para cada fase de cultivo se muestran en la Tabla 4.1, se muestra además las cantidades en g/l de bicarbonato y nutrientes suministrados para cada cultivo, y las tasas de crecimiento promedio que se muestran la Tabla 4.2.

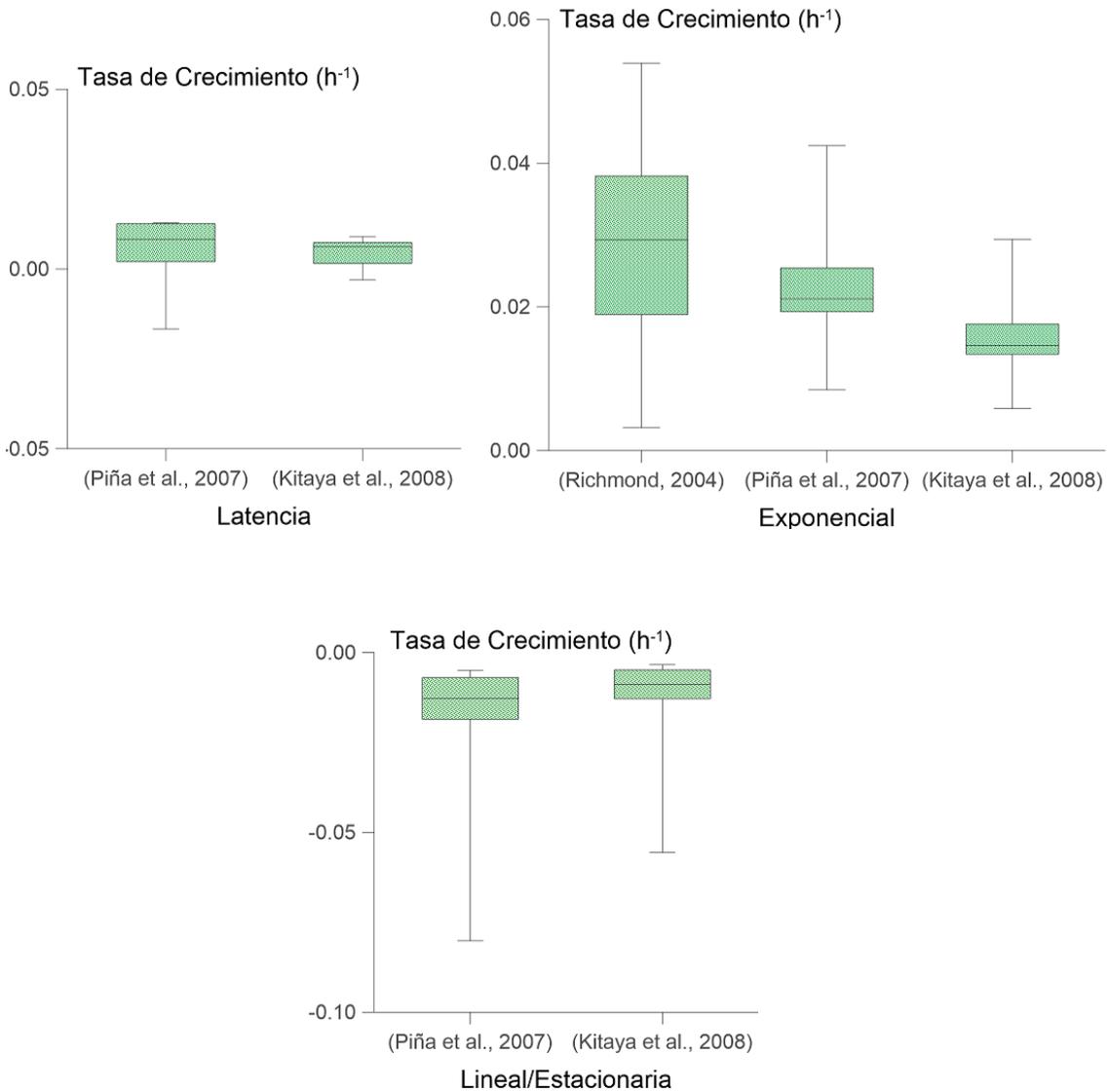
Además se realizaron análisis de los nutrientes suministrados a lo largo de la experimentación, en el que se analizaron los siguientes parámetros: fósforo como orto-fosfatos en 0.088%, nitrógeno como nitrógeno amoniacal un 0.54% y nitrógeno orgánico un 6.07%, lo que significa que el porcentaje restante de fósforo es orgánico y el porcentaje restante de nitrógeno puede ser nitritos o nitratos. Este análisis se realizó en una solución de 1g/l y puede observarse en el Anexo 1.

**Tabla 4.1 Tasas de crecimiento y fuentes de carbono y nitrógeno de la familia Chlorella**

| Cultivo | Tasas de Crecimiento |             |                     |       | Fuente de Carbono y Nutrientes |                               |
|---------|----------------------|-------------|---------------------|-------|--------------------------------|-------------------------------|
|         | Latencia             | Exponencial | Lineal/Estacionaria | Total | Bicarbonato (g/l)              | Nutrientes <sup>+</sup> (g/l) |
| 1       | -                    | 0.030       | -                   | 0.030 | 0.0287                         | 0.0503                        |
|         | 0.030                | 0.021       | -0.011              | 0.011 |                                |                               |
|         | 0.062                | 0.015       | -0.007              | 0.007 |                                |                               |
| 2       | -                    | 0.005       | -                   | 0.007 | 0.0560                         | 0.0210                        |
|         | 0.008                | 0.008       | -0.048              | 0.006 |                                |                               |
|         | 0.007                | 0.006       | 0.004               | 0.004 |                                |                               |
| 3       | -                    | 0.019       | -                   | 0.031 | 0.0668                         | 0.0909                        |
|         | 0.093                | 0.026       | -0.080              | 0.024 |                                |                               |
|         | 0.014                | 0.018       | -0.056              | 0.017 |                                |                               |
| 4       | -                    | 0.028       | -                   | 0.052 | 0.0683                         | 0.0968                        |
|         | 0.013                | 0.019       | 0.002               | 0.019 |                                |                               |
|         | 0.006                | 0.013       | 0.002               | 0.013 |                                |                               |
| 5       | -                    | 0.010       | -                   | 0.019 | 0.0687                         | 0.1003                        |
|         | 0.004                | 0.016       | 0.007               | 0.014 |                                |                               |
|         | 0.004                | 0.011       | 0.005               | 0.010 |                                |                               |
| 6       | -                    | 0.018       | -                   | 0.018 | 0.0674                         | 0.1020                        |
|         | 0.021                | 0.021       | 0.017               | 0.021 |                                |                               |
|         | 0.049                | 0.014       | 0.012               | 0.014 |                                |                               |
| 7       | -                    | 0.049       | -                   | 0.049 | 0.0699                         | 0.1006                        |
|         | 0.037                | 0.042       | -0.007              | 0.031 |                                |                               |
|         | 0.082                | 0.029       | -0.005              | 0.021 |                                |                               |
| 8       | -                    | 0.026       | -                   | 0.036 | 0.0648                         | 0.1028                        |
|         | -0.036               | 0.025       | 0.034               | 0.025 |                                |                               |
|         | -0.019               | 0.018       | 0.023               | 0.018 |                                |                               |
| 9       | -                    | 0.033       | -                   | 0.033 | 0.0663                         | 0.1011                        |
|         | 0.032                | 0.029       | -0.011              | 0.015 |                                |                               |
|         | 0.065                | 0.020       | -0.008              | 0.010 |                                |                               |
| 10      | -                    | 0.054       | -                   | 0.054 | 0.0658                         | 0.1005                        |
|         | 0.060                | 0.016       | -0.022              | 0.019 |                                |                               |
|         | 0.054                | 0.011       | -0.015              | 0.013 |                                |                               |
| 11      | -                    | 0.020       | -                   | 0.031 | 0.0710                         | 0.1040                        |
|         | 0.002                | 0.022       | -0.019              | 0.014 |                                |                               |
|         | 0.002                | 0.015       | -0.013              | 0.010 |                                |                               |
| 12      | -                    | 0.030       | -                   | 0.027 | 0.0729                         | 0.1113                        |
|         | -0.017               | 0.020       | -0.015              | 0.017 |                                |                               |
|         | -0.003               | 0.014       | -0.011              | 0.012 |                                |                               |
| 13      | -                    | 0.038       | -                   | 0.048 | 0.0729                         | 0.1114                        |
|         | 0.010                | 0.021       | -0.007              | 0.017 |                                |                               |
|         | 0.007                | 0.015       | -0.005              | 0.012 |                                |                               |
| 14      | -                    | 0.022       | -                   | 0.023 | 0.0728                         | 0.1126                        |
|         | 0.013                | 0.028       | -0.005              | 0.022 |                                |                               |
|         | 0.009                | 0.019       | -0.003              | 0.015 |                                |                               |

<sup>+</sup>12% de Nitrógeno, 12% Fósforo, 17% de Potasio, 2% de Magnesio

En la Figura 4.3 se observa un diagrama de cajas de las tasas de crecimiento para cada fase de crecimiento obtenidas a lo largo de la experimentación, utilizando los tres criterios antes mencionados; se observa que en la fase de latencia la distribución es similar y que en el análisis mediante el criterio de Piña et al. (2007) existe más dispersión, sin embargo esta dispersión está en un rango reducido. En la fase exponencial la distribución no es tan similar como en la fase de latencia, se observa que la dispersión es mayor para el criterio de Richmond (2004) que para los otros dos criterios, pero al igual que en el caso anterior esta no es considerablemente grande. Finalmente en la fase estacionaria o lineal se observa una distribución bastante similar aunque presenta mayor dispersión; esto representa confiabilidad en los datos obtenidos.



**Figura 4.3 Diagrama de cajas de las tasas de crecimiento**

En la Tabla 4.2 se muestran los valores de las tasas de crecimiento promedio obtenidos para la familia *Chlorella* durante toda la experimentación, se obtienen diferentes tasas para cada fase y para cada criterio. En la fase de latencia, la tasa de crecimiento según el criterio de Piña et al. (2007) y Kitaya et al. (2008) son iguales. En la fase exponencial existe más dispersión entre los criterios utilizados y es mayor a las tasas de crecimiento obtenidas en las fases de latencia y lineal. En la fase lineal o estacionaria se observa que los valores de tasas de crecimiento obtenidos son negativas debido a que en este punto las células están comenzando a morir. Finalmente se hace un análisis de las tasas de crecimiento para el cultivo en general, es decir sin diferenciarlo por fases usando para ello el número de células al inicio y final de todo el cultivo.

**Tabla 4.2 Tasas de crecimiento promedio para la familia *Chlorella***

| <i>Tasa de Crecimiento (<math>\mu</math>) (<math>h^{-1}</math>)</i> |                    |               |              |                       |
|---|--------------------|---------------|--------------|-----------------------|
| <i>Latencia</i>   | <i>Exponencial</i> | <i>Lineal</i> | <i>Total</i> | <i>Referencia</i>     |
| -   | 0.027              | -             | 0.035        | (Richmond, 2004)      |
| 0.0042  | 0.022              | -0.022        | 0.020        | (Piña et al., 2007)   |
| 0.0041  | 0.016              | -0.012        | 0.014        | (Kitaya et al., 2008) |

#### 4.5 Análisis de remoción de nutrientes

Se analizó fósforo como orto-fosfatos en mg/l, Nitrógeno amoniacal, Nitritos y Nitratos como Nitrógeno en mg/l, excepto el Nitrito que es medido en  $\mu\text{g/l}$ , durante 8 días de cultivo de la familia *Chlorella*, mediante espectrofotometría. Las concentraciones de nutrientes mostrados en la Figura 4.4, fueron medidas en el medio de cultivo (filtrando la biomasa algal). Se observa además que al inicio del cultivo las microalgas poseen una fuente de nitrógeno y fósforo que se va consumiendo mientras se desarrolla el crecimiento de las microalgas. Estos nutrientes van incorporándose a la composición celular de las microalgas. Los análisis realizados en el Laboratorio de Sanitaria de la Facultad de Ingeniería se pueden observar en el Anexo 2.

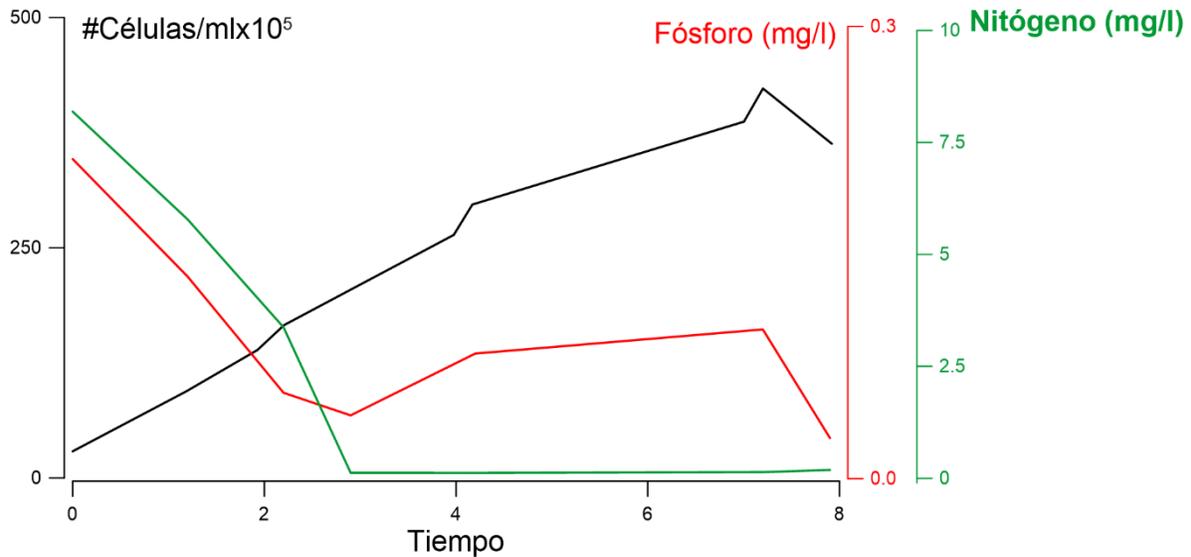


Figura 4.4 Análisis de remoción de nutrientes

#### 4.6 Análisis de sólidos suspendidos volátiles

Los sólidos suspendidos volátiles representan en gran medida a la materia orgánica soluble del medio, por lo que éste parámetro es muy útil para analizar las variaciones de crecimiento de las microalgas. Por lo tanto, se realizó una determinación de sólidos totales en todas las familias cultivadas durante todo el cultivo con tres muestras puntuales; obteniendo que, la familia *Chlorella* en su fase de latencia tiene un 41.25% de biomasa, 83.96% en la fase exponencial, y luego con un 79.09% comienza a apreciarse la disminución que corresponde a la fase estacionaria.

En la familia FF. Especie 1 el comportamiento es similar al de la familia *Chlorella*, iniciando en su fase de latencia con un 43.04% de biomasa, 72.43% en la fase exponencial, y 69.71% en la fase de latencia.

En la familia *Scenedesmus*, se inició con un 44.24% de biomasa, continua creciendo hasta el 63.17%. En la familia H1 se inició un 36.23% y se registra el crecimiento hasta el 68.70%. Finalmente la familia FF. Especie 3 inició con un 14.44% hasta 69.93%. En estas tres últimas familias no se llegó a registrar los porcentajes correspondientes a la fase estacionaria. Los análisis realizados en el Laboratorio de Sanitaria de la Facultad de Ingeniería se pueden observar en el Anexo 3.

## 4.7 Implementación de un respirómetro a escala laboratorio

El objetivo de la técnica respirométrica es medir la tasa de consumo biológico de oxígeno o tasa de respiración, bajo condiciones previamente conocidas. En esta experimentación la tasa de respiración está en función de la disponibilidad de oxígeno y de los nutrientes que serán consumidos por las microalgas. En la Figura 4.5 se muestra la implementación del respirómetro a escala laboratorio, así como otros cultivos con distintas familias de microalgas.



Figura 4.5 Implementación de cultivos de microalgas y respirómetro

### 4.7.1 Protocolo de experimentación para respirometría

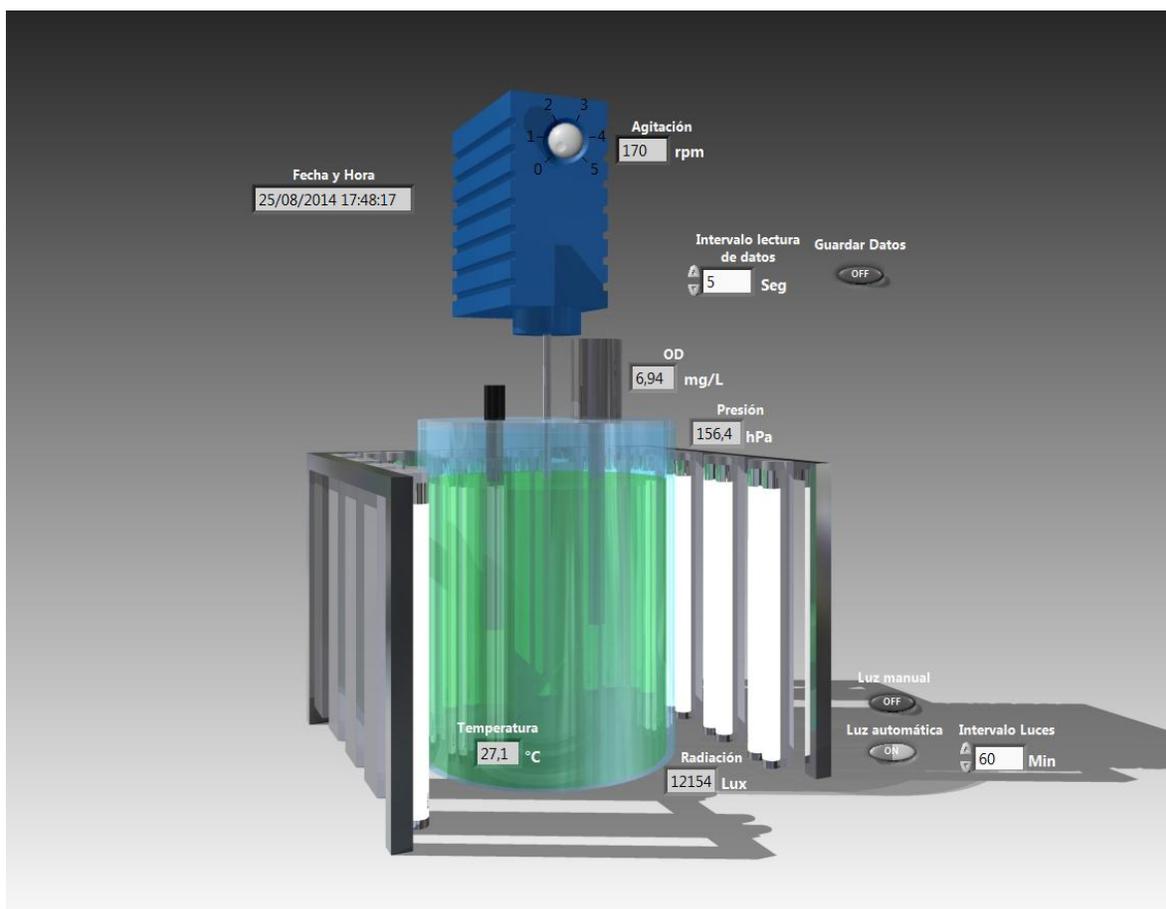
La experimentación respirométrica es controlada por el programa desarrollado en el software LabVIEW, el cual se encarga de adquirir datos del sensor InPro 6870i, visualizarlos en el panel frontal y almacenarlos en un archivo TDMS. En esta sección se explica paso a paso la ejecución de este programa.

En el panel frontal:

1. Se ingresa el intervalo de tiempo en el que se desea adquirir y visualizar los datos medidos por el sensor InPro 6870i (sensor de OD, Temperatura y Presión).
2. En el menú de ejecución del panel frontal, se acciona el botón *Run* para correr el programa.

3. Se ingresa el intervalo de tiempo en el que se activará o desactivará la irradiación. Se pulsa el botón de luz automática.
4. Finalmente si se desea guardar los datos medidos, se pulsa el botón guardar datos, se selecciona el sitio en donde se guardará el archivo y se asigna un nombre. El programa cuenta también con un botón denominado luz manual que sirve para controlar manualmente la irradiación.

En la Figura 4.6 se muestra el panel frontal del programa desarrollo con la asesoría del personal del proyecto de Investigación financiado por la DIUC, Universidad de Cuenca.



**Figura 4.6 Panel Frontal del programa de control del respirómetro**

El programa registra datos de: tiempo, oxígeno disuelto (mg/l), presión (hPa), temperatura (°C), bajo condiciones conocidas de irradiación (Lx), agitación (rpm) y nutrientes (g/l). Estos datos son almacenados en un archivo TDMS, que es compatible con Excel, el formato de salida de este archivo se visualiza en la Tabla 4.3.

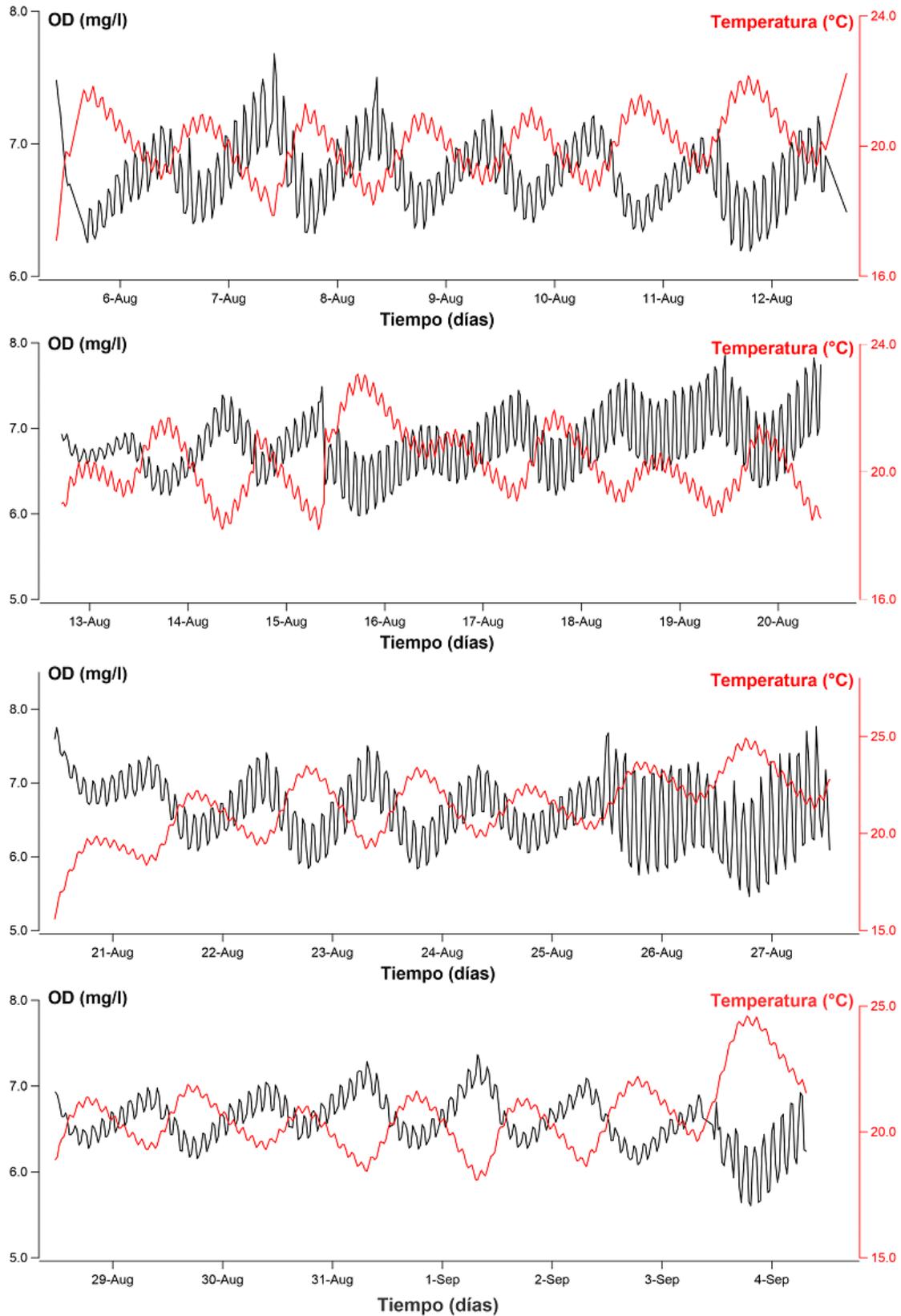
**Tabla 4.3 Formato de salida del registro de datos**

| Time                       | Time* | OD (Formula Result) | Temp (Formula Result) | Presion (Formula Result) |
|----------------------------|-------|---------------------|-----------------------|--------------------------|
| 28/08/2014 11:27:38.574 AM | 0     | 6.93                | 18.9                  | 155.2                    |
| 28/08/2014 11:28:13.593 AM | 0.02  | 6.92                | 18.8                  | 155.2                    |
| 28/08/2014 11:28:19.107 AM | 0.04  | 6.93                | 18.8                  | 155.1                    |
| 28/08/2014 11:28:24.621 AM | 0.06  | 6.95                | 18.9                  | 155.1                    |
| 28/08/2014 11:28:30.134 AM | 0.08  | 6.94                | 18.8                  | 155.1                    |
| 28/08/2014 11:28:35.646 AM | 0.1   | 6.97                | 18.8                  | 155.1                    |
| 28/08/2014 11:28:41.159 AM | 0.12  | 7.01                | 18.9                  | 155.2                    |
| 28/08/2014 11:28:46.672 AM | 0.14  | 6.88                | 18.8                  | 155.1                    |
| 28/08/2014 11:28:52.187 AM | 0.16  | 6.96                | 18.8                  | 155                      |
| 28/08/2014 11:28:57.701 AM | 0.18  | 6.95                | 18.9                  | 155                      |
| 28/08/2014 11:29:03.214 AM | 0.2   | 6.94                | 18.9                  | 155.1                    |
| 28/08/2014 11:29:08.727 AM | 0.22  | 6.91                | 18.8                  | 155.1                    |
| 28/08/2014 11:29:14.240 AM | 0.24  | 6.96                | 18.8                  | 155                      |
| 28/08/2014 11:29:19.753 AM | 0.26  | 6.95                | 18.8                  | 155                      |
| 28/08/2014 11:29:25.265 AM | 0.28  | 6.96                | 18.8                  | 154.9                    |

#### 4.7.2 Resultados de la experimentación respirométrica

En la Figura 4.7 se muestran las curvas típicas de la variación del consumo de oxígeno medido en miligramos de oxígeno disuelto por litro (mg/l); y de la temperatura medida en grados centígrados (°C) de cuatro cultivos durante aproximadamente 7-8 días que es el tiempo promedio de duración de un cultivo. Se observa que las curvas de oxígeno disuelto (OD) y las curvas de temperatura tienen secuencias opuestas durante toda la fase de cultivo, este comportamiento se debe a que el OD disminuye cuando aumenta la temperatura y viceversa. Se aprecia una influencia notable de los factores ambientales en los cultivos, notándose que durante el día la actividad fotosintética de las algas es determinante en la producción de oxígeno. Se observa también que las curvas con ciclos diarios presentan una variabilidad horaria que se explica por los ciclos de encendido y apagado de la iluminación artificial en los cultivos.

En promedio en todos los cultivo de microalgas, el OD varía en un rango de 5.43-7.97 mg/l correspondiendo el valor mínimo a la fase de muerte celular y el valor máximo corresponde a la fase de crecimiento exponencial. La temperatura oscila entre 15.6 - 24.9 °C; y, al ser esta curva, inversa a la del OD los valores mínimos y máximos corresponden a la fase exponencial y a la fase de muerte respectivamente.

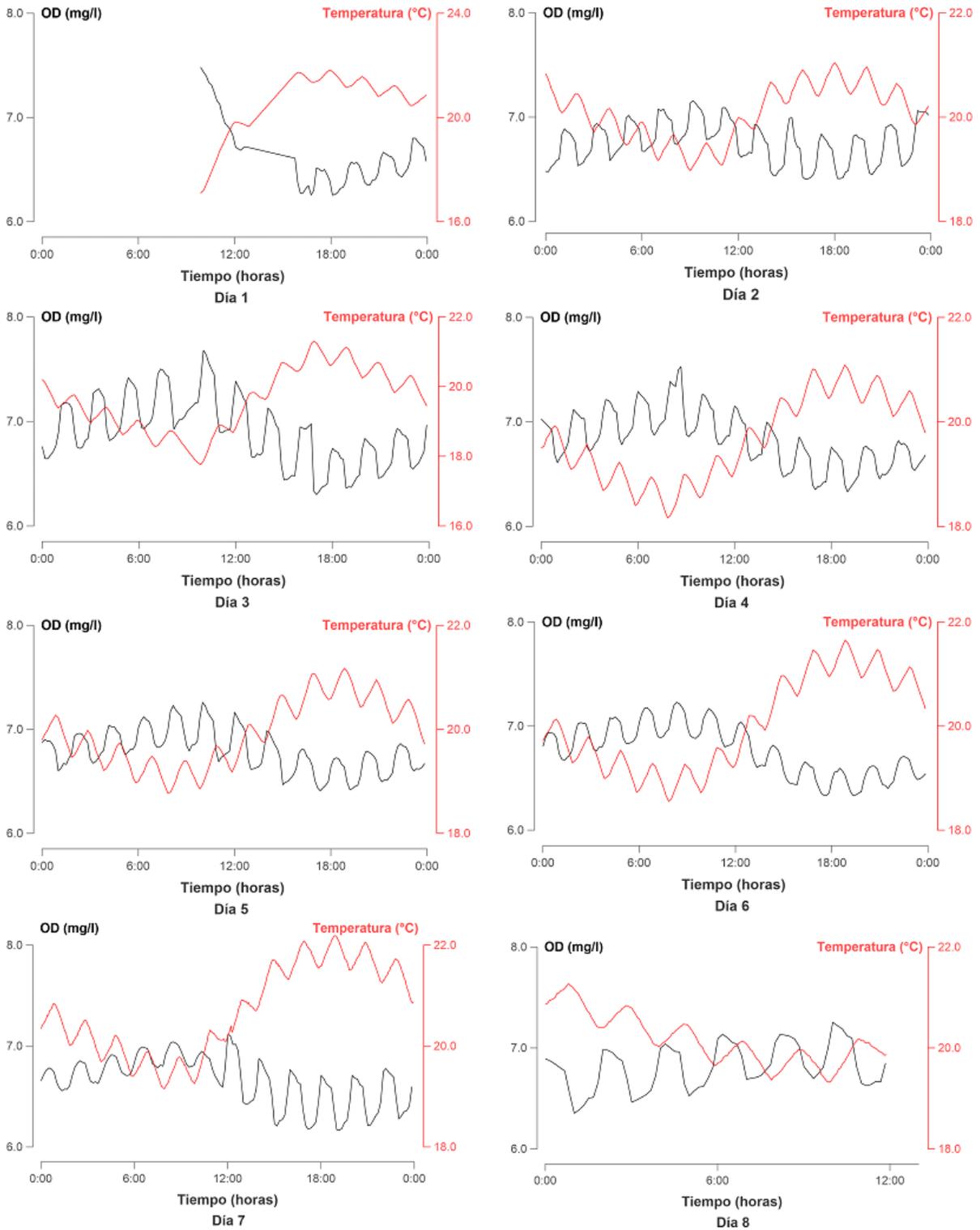


**Figura 4.7** Curvas típica de la variación de oxígeno disuelto y temperatura obtenida de cuatro cultivos.

En la Figura 4.8 se muestra en mayor detalle las variaciones diarias de OD y Temperatura durante un cultivo de la familia Chlorella, el día 1 muestra la variación de la fluctuación de OD y Temperatura correspondientes a la fase de latencia, se observa un comportamiento de adaptabilidad en las primeras horas del cultivo.

En el día 2 el comportamiento muestra variación casi lineal a lo largo del día, parte de este aún corresponde a la fase de latencia; en los días 3, 4, 5 corresponden a la fase de crecimiento exponencial, en esta fase las algas están creciendo con gran rapidez por lo que los niveles de OD aumentan, también se observa que durante las primeras horas del día, hasta aproximadamente el medio día el OD aumenta mientras que en las siguientes horas este disminuye, esto se debe a que en la tarde la temperatura ambiental se incrementa y esto influye en la temperatura de los reactores, y el OD al ser un gas, aumenta su volatilidad y escapa al ambiente y su cantidad disminuye.

El día 6 la variación de OD y Temperatura es menor, ya no se observa la diferencia en la mañana y en la tarde, debido a que el día 6 corresponde a la fase estacionaria o lineal en donde las algas dejan de reproducirse, y el día 7 corresponde a la fase de muerte, en este período las algas han comenzado a morir y debido a su descomposición se consume más oxígeno en el reactor, lo que provoca la disminución del OD.



**Figura 4.8 Variación diaria de OD y Temperatura de un cultivo de Chlorella**

La Figura 4.9 muestra la variación típica de OD e irradiación durante diez horas de un día de cultivo, se observa que el OD crece a medida que la irradiación lo hace, de igual manera si la irradiación disminuye el OD también disminuye, este

comportamiento corresponde claramente al proceso fotosintético que las microalgas realizan por lo que producen más OD en presencia de luz. Se observa que a medida que transcurre el día la irradiación tiende a disminuir ya que la luz natural proveniente del Sol que reciben los reactores, cambia de posición a lo largo del día.

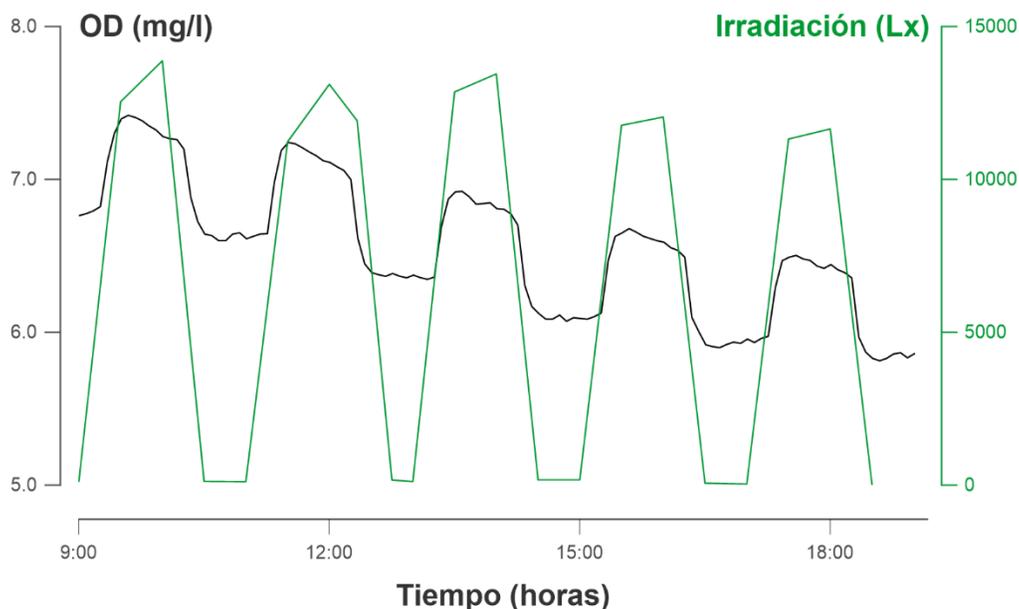


Figura 4.9 Variación diaria de OD e Irradiación, especie *Chlorella* de 9H00 a 19H00

### 4.7.3 Experimentos finales

Al final de esta investigación se realizaron experimentaciones con tres cultivos de la familia *Chlorella* con similares condiciones de densidad celular, cantidad de nutrientes, irradiación, agitación y aireación pero con una variante en la dosificación de la fuente de carbono inorgánico, utilizando en el primer cultivo únicamente  $\text{CO}_2$ , en el segundo bicarbonato de sodio y en el tercero, bicarbonato de sodio, pero en este el pH se controló mediante burbujeros de  $\text{CO}_2$ .

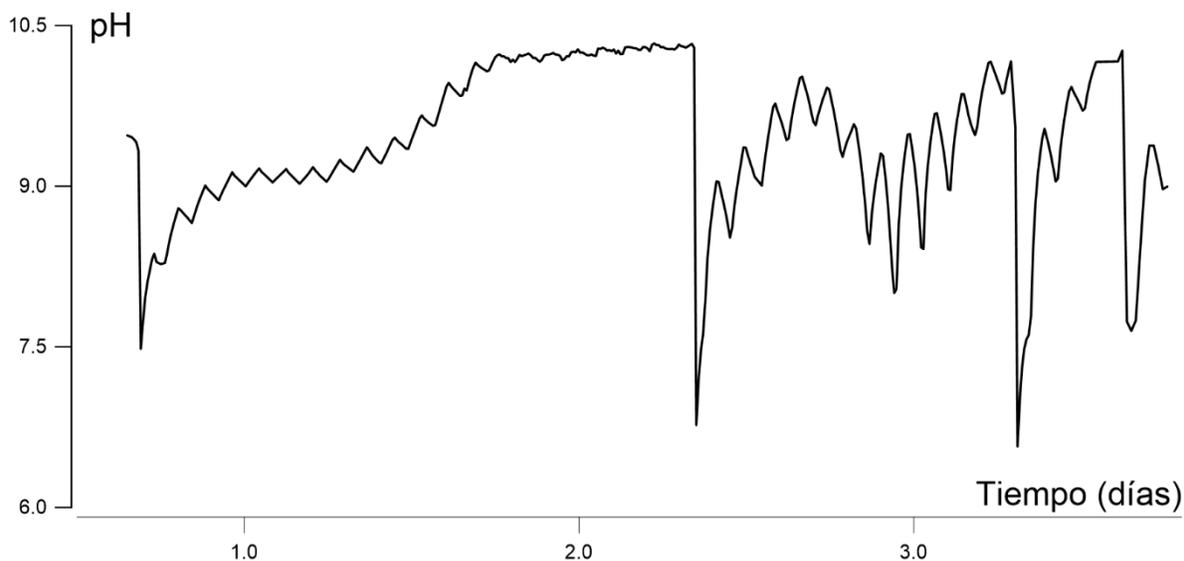
En el primer cultivo el pH fue controlado manualmente mediante la adición de  $\text{CO}_2$  para evitar valores mayores de 8.5. En el segundo cultivo se inició con un pH de 8.2 y este ascendió hasta 10.7. En el tercer cultivo se controló y registró el pH de forma continua durante tres días, con datos cada 30 segundos, esta variación se muestra en la Figura 4.10. Normalmente el pH tiende a subir debido al consumo de carbono de las microalgas, pero en esta última experimentación se controló manualmente este valor para que fluctúe alrededor de 8, los picos mostrados en la Figura 4.10 corresponden a las adiciones de  $\text{CO}_2$ .

Para comparar el crecimiento de los tres cultivos se realizó mediciones de turbiedad dos veces al día (ver Tabla 4.4): al inicio del cultivo se observa que la turbiedad es muy similar, pero a medida que pasa el tiempo el cultivo dosificado con CO<sub>2</sub> crece ligeramente más rápido que los otros dos, con lo que se puede concluir que el suministro de CO<sub>2</sub> como fuente de carbono es igual o más eficiente que el bicarbonato de sodio.

**Tabla 4.4 Análisis de crecimiento por turbiedad**

| <i>Turbiedad (NTU)</i> |             |                  |                  |                  |
|------------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>Día</i>             | <i>Hora</i> | <i>Cultivo 1</i> | <i>Cultivo 2</i> | <i>Cultivo 3</i> |
| 1                      | 18:30:00    | 12.16            | 11.48            | 12.06            |
| 2                      | 9:50:00     | 13.06            | 14.79            | 18.71            |
|                        | 18:50:00    | 13.84            | 12.22            | 19.24            |
| 3                      | 9:30:00     | 18.41            | 13.79            | 20.12            |
|                        | 14:30:00    | 25.22            | 19.05            | 35.54            |
| 4                      | 9:30:00     | 31.06            | 23.12            | 46.15            |
|                        | 15:50:00    | 39.58            | 32.27            | 54.51            |
| 5                      | 9:30:00     | 54.24            | 56.42            | 69.69            |
|                        | 15:40:00    | 107.4            | 86.76            | 98.81            |

A pesar de estos resultados, se requiere de instalaciones adecuadas para suministrar CO<sub>2</sub> en cultivos de microalgas a escala laboratorio, siguiendo todos los procedimientos de seguridad industrial para controlar eventualidades como fugas.



**Figura 4.10 Variación de pH**

## 4.8 Resultados de la concentración de lípidos de microalgas

La concentración de lípidos de microalgas varía según la familia, las condiciones de crecimiento, la temperatura, el solvente utilizado y el tiempo de extracción.

En la Tabla 4.5 se muestra los porcentajes de lípidos obtenidos mediante extracción Soxhlet con las familias *Chlorella*, *Scenedesmus* y FF. Especie 3 utilizando diferentes solventes. La Tabla 4.5, explica además el tiempo de duración de cada ensayo, el número de sifonamientos y la temperatura aproximada a la que se realizó la extracción. El residuo obtenido después de la extracción Soxhlet no es solamente lípidos, sino que además incluye un cierto porcentaje de clorofila, que depende del solvente utilizado pudiendo ser hasta más del 1% (Ramluckan et al., 2014). En esta investigación no es separada del residuo ya que se requiere de instrumentación que no se dispone en el laboratorio.

**Tabla 4.5 Porcentaje de lípidos más clorofila obtenidos mediante extracción Soxhlet**

| <i>Extracción de lípidos Método Soxhlet</i> |                         |                    |                           |                         |                       |                              |
|---|-------------------------|--------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------|
| <i>Especie</i>                              | <i>Peso muestra (g)</i> | <i>Solvente</i>    | <i># de Sifonamientos</i> | <i>Temperatura (°C)</i> | <i>Tiempo (horas)</i> | <i>% Lípidos + clorofila</i> |
| Chlorella                                   | 3.9988                  | Metanol            | 10                        | 150                     | 4                     | 10.3                         |
| Chlorella                                   | 5.0049                  | Metanol-Cloroformo | 17                        | 150                     | 7                     | 23.7                         |
| Chlorella                                   | 1.043                   | Metanol-Cloroformo | 10                        | 75                      | 9                     | 15.4                         |
| Chlorella                                   | 2.1485                  | Metanol-Cloroformo | 7                         | 75                      | 7                     | 19.0                         |
| Chlorella                                   | 2.0195                  | Hexano             | 11                        | 75                      | 8.5                   | 5.2                          |
| Chlorella triturada                         | 2.1123                  | Hexano-Acetona     | 13                        | 65                      | 9.5                   | 5.7                          |
| Chlorella liofilizada                       | 2.5465                  | Cloroformo-Etanol  | 9                         | 98                      | 6                     | 13.9                         |
| Scenedesmus liofilizada                     | 1.5038                  | Metanol-Cloroformo | 9                         | 75                      | 9                     | 21.3                         |
| Scenedesmus triturada                       | 1.5109                  | Metanol-Cloroformo | 6                         | 75                      | 9                     | 16.7                         |
| FF. Especie 3                               | 2.2513                  | Metanol-Cloroformo | 8                         | 98                      | 6                     | 14.8                         |

En los primeros ensayos Soxhlet realizados, se utilizó una temperatura aproximada de 150°C generando un mayor número de sifonamientos en menor tiempo; sin embargo, el residuo obtenido tenía aspecto quemado. En ensayos posteriores se utilizó la temperatura del punto de ebullición de los solventes, obteniéndose menos sifonamientos en más tiempo lo que aparentemente resulta menos eficiente. Este aspecto es sin duda muy importante y será abordado por otro trabajo experimental posterior.

Se utilizaron solventes puros y en mezcla con otros, en una relación conocida, así tenemos los siguientes:

- Metanol
- Hexano
- Metanol-Cloroformo 2:1
- Hexano-Acetona 1:1

- Etanol-Cloroformo 1:1

En la Tabla 4.5 se observa que el contenido de lípidos varía según el tipo de solvente usado, así tenemos que la mezcla Metanol-Cloroformo es la que más porcentaje de lípidos más clorofila extrae. La mezcla Hexano-Acetona y Hexano puro extraen un porcentaje muy similar de lípidos más clorofila. Finalmente la mezcla Cloroformo-Etanol extrae más que la mezcla Hexano-Acetona y Hexano puro, pero menos que la mezcla Metanol-Cloroformo.

También se puede ver que en la extracción de lípidos de la familia Scenedesmus el porcentaje de lípidos más clorofila es mayor cuando la muestra se encuentra liofilizada que cuando está triturada.

## CAPÍTULO 5

### 5 Conclusiones y recomendaciones

#### 5.1 Cultivo de microalgas a escala laboratorio

Las condiciones ambientales que sin duda influyen en el crecimiento de microalgas son la luz, la temperatura, la agitación, las fuentes disponibles de nutrientes y carbono y la aireación. El cuidado y mantenimiento de los cultivos es muy importante ya que estos son susceptibles a la contaminación ya sea entre familias u otros microorganismos como hongos.

El tamaño de los reactores es un punto clave para la producción de biomasa, por lo que se recomienda implementar reactores de mayor capacidad para obtener mayor cantidad de biomasa para realizar más experimentaciones.

La cosecha de biomasa representa el costo más alto en la producción de cultivos de microalgas para el aprovechamiento de lípidos. A pesar del gran interés en investigaciones en este tema en el mundo, en la actualidad todavía no existen técnicas de laboratorio estandarizadas para este procedimiento, por lo que se recomienda realizar estudios más profundos en esta línea.

En los análisis de tasas de crecimiento realizados se concluye que los criterios de Piña et al. (2007) y Kitaya et al. (2008) son similares ya que para obtener las tasas de crecimiento usan en su formulación el número de células presentes al inicio y final de cada fase de crecimiento, así como el tiempo que dura cada una de estas, mientras que el criterio de Richmond (2004) usa únicamente el tiempo de duplicación celular. Además mediante el criterio de Piña et al. (2007), se obtienen tasas de crecimiento muy semejantes a otras revisadas en la literatura especializada.

De los análisis de nutrientes se puede concluir que efectivamente las microalgas incorporan en su composición celular nitrógeno y fósforo durante su acelerado crecimiento por lo que su cultivo en aguas residuales domésticas normalmente ricas en nutrientes, constituye una práctica altamente viable y sustentable.

#### 5.2 Dosificación de carbono

En experimentos finales realizados con dióxido de carbono como fuente de Carbono inorgánico para las microalgas se pudo advertir un ligero incremento de la productividad algal en comparación con la adición de bicarbonato de sodio. Es

conveniente, por lo tanto, realizar investigaciones para cuantificar la cantidad de CO<sub>2</sub> que se debe adicionar al cultivo para obtener un alto crecimiento, ya que ésta fuente de carbono es más económica y fácil de suministrar. Sin embargo, es muy importante anotar que este procedimiento experimental requiere de adecuadas medidas de seguridad para el personal.

### **5.3 Puesta en marcha del respirómetro.**

Con la automatización de las mediciones de consumo de oxígeno se puede lograr medir la actividad fotosintética que realizan las microalgas. Sin embargo se requiere automatizar el control de algunos factores de crecimiento como el pH que deberían medirse durante todo el cultivo con equipos que puedan registrar datos continuamente. En investigaciones previas se ha encontrado que el pH debería oscilar entre 8.2-8.7 para lograr un óptimo crecimiento, para lo cual se podría implementar un control de pH que indique cuando se sobrepasen estos valores, así por ejemplo si el pH es mayor a 8.5 se puede adicionar burbujes de CO<sub>2</sub> o goteos de soluciones ácidas, en caso de ser menor a 8.2 se puede adicionar bicarbonato, carbonato o base; todo esto mediante electroválvulas que deben estar controladas en la automatización del respirómetro para las dosificaciones necesarias.

Sería óptimo realizar mediciones de las fluctuaciones de Nitrógeno mediante sensores que registren datos continuamente en el reactor, con la finalidad de no perder biomasa y obtener la variabilidad del consumo de nitrógeno y observar el comportamiento de las microalgas.

### **5.4 Extracción de lípidos**

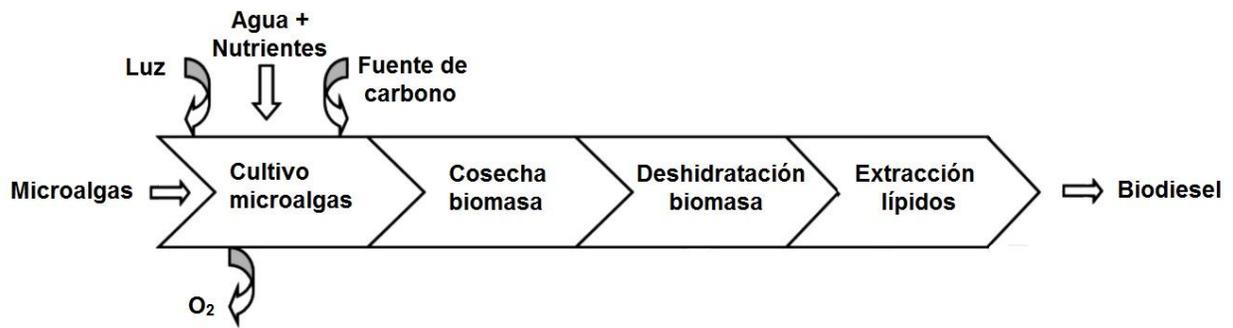
Después de la extracción Soxhlet se obtiene un residuo que posee básicamente lípidos y clorofila, se recomienda en un futuro experimentar la separación de estos componentes para analizar la calidad de biocombustible que se podría obtener.

Al parecer mediante liofilización se extrae una mayor cantidad de lípidos más clorofila, esto puede deberse a que esta técnica divide con mayor eficiencia las células manteniendo sus propiedades y esto facilita el contacto entre todas las partículas con el solvente, sin embargo se debería realizar más investigaciones sobre técnicas de deshidratación de la biomasa y hacer comparaciones de cómo estas afectan en la obtención de lípidos.

Se recomienda realizar investigaciones acerca de la conversión de lípidos de microalgas a biocombustible, talvez mediante técnicas como licuefacción termoquímica o pirolisis.

Según los resultados preliminares obtenidos de la extracción de lípidos se observa que los porcentajes de lípidos más clorofila obtenidos de extracciones utilizando Etanol-Cloroformo son ligeramente menores que al utilizar Metanol-Cloroformo. Se recomienda por lo tanto, realizar más ensayos con diferentes variantes del Etanol, ya que este es de muy fácil accesibilidad y de bajo costo. También se podría probar con distintas combinaciones de solventes, para encontrar una óptima extracción en cuanto a cantidad y calidad de lípidos y considerar aspectos como accesibilidad y costos de los solventes.

Finalmente en la Figura 5.1 se resumen las etapas seguidas para la producción de biodiesel a partir de microalgas, que en esta investigación se implementó desde el inicio del cultivo hasta la extracción de lípidos.



**Figura 5.1** Flujograma de producción de biocombustible a partir de microalgas adaptado de (Arias Peñaranda et al., 2013)

## REFERENCIAS

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A. and Ibraheem, I.B.M. (2012) Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19(3), 257-275.
- Alcántara, C., García-Encina, P.A. and Muñoz, R. (2013) Evaluation of mass and energy balances in the integrated microalgae growth-anaerobic digestion process. *Chemical Engineering Journal* 221, 238-246.
- Alvarado, A. (2013) Advanced dynamic modelling of wastewater treatment ponds. PhD thesis, Ghent University, Belgium.
- Alvarado, A., Vedantam, S., Goethals, P. and Nopens, I. (2012) A compartmental model to describe hydraulics in a full-scale waste stabilization pond. *Water Research* 46(2), 521-530.
- ANDES (2013) Primer Laboratorio de Biotecnología en Ecuador permitirá producir biocombustible, Ecuador
- Araujo, G.S., Matos, L.J., Fernandes, J.O., Cartaxo, S.J., Goncalves, L.R., Fernandes, F.A. and Farias, W.R. (2013) Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. *Ultrason Sonochem* 20(1), 95-98.
- Arias Peñaranda, M.T., Martínez Roldán, A.d.J. and Cañizares Villanueva, R.O. (2013) Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos *Acta biológica Colombiana* 18, 43-68.
- Bastidas, O. (2011) Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting Celeromics
- Bermúdez, L.M.S. (2012) Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. Master Thesis, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Brennan, L. and Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2), 557-577.
- Carmona, F.J., Vázquez, F.J., Martín, A. and Chica, A. (2004) Diseño y construcción de un respirómetro.
- Cobelas, M.A. and Gallardo, T. (1989) Una revisión sobre la biotecnología de las algas, p. 60, España.
- Craggs, R.J., Davies-Colley, R.J., Tanner, C.C. and Sukias, J.P. (2003) Advanced pond system: performance with high rate ponds of different depths and areas. *Water Science and Technology* 48(2), 259-267.
- Craggs, R.J., Sukias, J.P., Tanner, C.T. and Davies-Colley, R.J. (2004) Advanced pond system for dairy-farm effluent treatment. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 449-460.
- Crites, R. and Tchobanoglous, G. (2000) Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones McGraw-Hill Interamericana, S.A.

- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294-306.
- Decostere, B., Janssens, N., Alvarado, A., Maere, T., Goethals, P., Van Hulle, S.W.H. and Nopens, I. (2013) A combined respirometer–titrimeter for the determination of microalgae kinetics: Experimental data collection and modelling. *Chemical Engineering Journal* 222, 85-93.
- Durazno, G. (2009) Resultados de la Evaluación de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (Periodo: Noviembre de 1999 - Diciembre del 2009), p. 294, ETAPA, Cuenca, Ecuador.
- Fogg, G.E. and Thake, B. (1987) *Algae Cultures and Phytoplankton Ecology*, The University of Wisconsin Press.
- Guarín Villamizar, O.D., Navas, C.V. and Ardila Jaime, J.A. (2013) Diseño y validación de un prototipo de respirómetro para medida de CO<sub>2</sub> en suelos contaminados
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K. and Webley, P.A. (2011) Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology* (102), 178-185.
- Janssens, N. (2010) Characterization of algal diversity and kinetics in waste stabilization ponds; Master thesis, Ghent University.
- Jonker, J.G.G. and Faaij, A.P.C. (2013) Techno-economic assessment of microalgae as feedstock for renewable bio-energy production. *Applied Energy* 102, 461-475.
- Kitaya, Y., Xiao, L., Masuda, A., Ozawa, T., Tsuda, M. and Omasa, K. (2008) Effects of temperature, photosynthetic photon flux density, photoperiod and O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations on growth rates of the symbiotic dinoflagellate, *Amphidinium* sp. *Applied Phycology* 20, 287-292.
- Kumar, P.S., Pavithra, J., Suriya, S., Ramesh, M. and Kumar, K.A. (2014) *Sargassum wightii*, a marine alga is the source for the production of algal oil, bio-oil, and application in the dye wastewater treatment. *Desalination and Water Treatment*, 1-17.
- Lee, Y.-K. and Shen, H. (2004) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* Richmond, A. (ed), pp. 40-56, Blackwell Publishing Ltd.
- Lee, Y.K. (2001) Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Applied Phycology* (13), 307-315.
- Mara, D. (2004) *Domestic wastewater treatment in developing countries* Earthscan London.
- Mara, D. (2009) Waste stabilization ponds: Past, present and future. *Desalination and Water Treatment*, 4, 85-88.
- Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (14), 217-232.
- Metcalf and Eddy (1995) *Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, vertido y reutilización*, McGraw-Hill, Madrid

- Park, J.B.K., Craggs, R.J. and Shilton, A.N. (2010) Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* (102), 35-42.
- Pearson, H. (2005) *Pond Treatment Technology*. Shilton, A. (ed), pp. 14-48, IWA Publishing, London.
- Petersen, B., Gernaey, K. and Vanrolleghem, P.A. (2001) Practical identifiability of model parameters by combined respirometric-titrimetric measurements. *Water Science and Technology* 43(7), 347-355.
- Piedrola, G. (2000) *Medicina Preventiva y Salud Pública*, Masson S.A.
- Piña, P., Medina, M.A., Nieves, M., Leal, S., López-Elías, J.A. and Guerrero, M.A. (2007) Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura 225-236.
- Ramluckan, K., Moodley, K.G. and Bux, F. (2014) An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel* 116, 103-108.
- Rengel, A. (2000) *Agua para Consumo Humano: Tratamiento de Aguas Residuales Cuenca*.
- Richmond, A. (2004) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science Ltd.
- Ríos, S.D., Castañeda, J., Torras, C., Farriol, X. and Salvadó, J. (2013) Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: Screening studies toward biodiesel production. *Bioresource Technology* (133), 378-388.
- Romo Piñera, A.K. (2002) *Manual para el cultivo de microalgas*, Universidad Autónoma de Baja California Sur
- Ruiz Martínez, A. (2011) *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente*. Master, Universidad Politécnica de Valencia Valencia.
- Sah, L., Rousseau, D. and Hooijmans, C. (2012) Numerical Modelling of Waste Stabilization Ponds: Where Do We Stand? *Water, Air, & Soil Pollution* 223(6), 3155-3171.
- Santacesaria, E., Vicente, G.M., Di Serio, M. and Tesser, R. (2012) Main technologies in biodiesel production: State of the art and future challenges. *Catalysis Today* 195 (1), 2-13.
- Shilton, A. (2005) *Pond Treatment Technology*, IWA Publishing, London.
- Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A.H., Haik, Y. and Farid, M. (2014) Effective extraction of microalgae lipids from wet biomass for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy* 66, 159-167.
- Torrents, A., Mas, J., Muñoz, F.X. and del Campo, F.J. (2012) Design of a microfluidic respirometer for semi-continuous amperometric short time biochemical oxygen demand (BOD<sub>st</sub>) analysis. *Biochemical Engineering Journal* 66, 27-37.

Uggetti, E., Sialve, B., Latrille, E. and Steyer, J.-P. (2014) Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresource Technology*, 437–443.

Valbuena, D., Díaz-Suárez, O., Botero-Ledesma, L. and Cheng-Ng, R. (2002) DETECCIÓN DE HELMINTOS INTESTINALES Y BACTERIAS INDICADORAS DE CONTAMINACIÓN EN AGUAS RESIDUALES, TRATADAS Y NO TRATADAS. *Interciencia*, 710-714.

von Sperling, M. (2007a) *Biological Wastewater Treatment Series: Waste Stabilisation Ponds*, IWA Publishing.

von Sperling, M. (2007b) *Biological Wastewater Treatment Series: Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal*, IWA Publishing, Londres.

Yáñez, F. (1993) *Lagunas de Estabilización: Teoría, Evaluación y Mantenimiento*, Monsalve, Cuenca.

## Anexos

### Anexo 1 Análisis de Nutrientes

#### LABORATORIO DE SANITARIA

| RESULTADOS DE ANALISIS FISICO-QUIMICO DE AGUA |                         |
|---|-------------------------|
| Muestra procedencia:                          | Alimento para algas     |
| Condiciones climatológicas:                   | Laboratorio             |
| Fecha de Análisis:                            | 31 de Julio del 2014    |
| Solución de análisis:                         | 1gr/L                   |
| Análisis solicitado por:                      | Ing. Andrés Alvarado M. |

| PARAMETRO              | 14 de Julio | UNIDAD           | OBSERVACIONES    |
|------------------------|-------------|------------------|------------------|
| CONDUCTIVIDAD          | 1371,0      | microsiemens/ cm |                  |
| PH                     | 6,18        |                  |                  |
| P.ORTOFOSFATOS TOTALES | 0,088       | %                | como Ortofosfato |
| N. AMONICAL            | 0,54        | %                | como Nitrógeno   |
| N. ORGANICO            | 6,07        | %                | como Nitrógeno   |

Responsable:

  
Dra. Guillermina Pauta C.  
JEFE DE LABORATORIO



UNIVERSIDAD DE CUENCA  
desde 1867

## Anexo 2 Análisis de remoción de nutrientes

## LABORATORIO DE SANITARIA

| RESULTADOS DE ANALISIS FISICO-QUIMICO DE AGUA |   |
|---|---|
| Muestra procedencia:                          | Reactor de microalgas: especie chorella |
| Tipo de fuente:                               | Laboratorio                             |
| Condiciones climatológicas:                   | 14 al 22 de julio del 2014              |
| Fecha de Análisis:                            |   |
| Análisis solicitado por:                      | Ing. Andrés Alvarado M.                 |

| PARAMETRO                  | 14 de Julio | 15 de Julio | 16 de Julio | 17 de Julio | 18 de Julio | 21 de Julio | 22 de Julio | UNIDAD           | OBSERVACIONES    |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|------------------|
| CONDUCTIVIDAD              | 536         | 734         | 611         | 257         | 459         | 269         | 249,0       | microsiemens/ cm |                  |
| PH                         | 8,49        | 8,07        | 8,25        | 9,2         | 9,57        | 7,89        | 9,17        |                  |                  |
| P. ORTOFOSFATOS DISUELTOS. | 0,212       | 0,134       | 0,057       | 0,042       | 0,083       | 0,099       | 0,027       | mg/l             | como Ortofosfato |
| N. AMONIAICAL              | 3,325       | 1,596       | 0,1064      | 0,0572      | 0,0266      | 0,065       | 0,013       | mg/l             | como Nitrógeno   |
| N. NITRITOS                | 4,148       | 6,22        | 45,25       | 3,228       | 0,0         | 2,02        | 0,4         | ug/l             | como Nitrógeno   |
| N. NITRATOS                | 4,86        | 4,179       | 3,222       | 0,063       | 0,094       | 0,073       | 0,173       | mg/l             | como Nitrógeno   |

Responsable:



Dra. Guillermina Pastora C.  
QUIMICO-ANALISTA

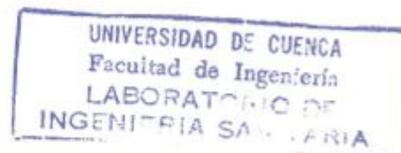


**Anexo 3 Análisis de Sólidos Totales****DETERMINACION DE SOLIDOS**

Fecha: Lunes 25 de agosto del 2014

| PARAMETRO                     | SCENEDESMUS | H1     | ESPECIE 3 |
|-------------------------------|-------------|--------|-----------|
| SOLIDOS TOTALES               | 926,67      | 460,00 | 923,33    |
| SOLIDOS TOTALES FIJOS         | 516,67      | 293,33 | 790,00    |
| SOLIDOS TOTALES VOLATILES     | 410,00      | 166,67 | 133,33    |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES   | 343,33      | 193,33 | 66,67     |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS FIJOS     | 93,33       | 56,67  | 63,33     |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS VOLATILES | 250,00      | 136,67 | 3,33      |
| SOLIDOS DISUELTOS TOTALES     | 583,33      | 266,67 | 856,67    |
| SOLIDOS DISUELTOS FIJOS       | 423,33      | 236,67 | 726,67    |
| SOLIDOS DISUELTOS VOLATILES   | 160,00      | 30,00  | 130,00    |

Responsable:

  
 Dra. Guillermina Papatá C.  
**QUIMICO-ANALISTA**

 UNIVERSIDAD DE CUENCA  
*desde 1867*



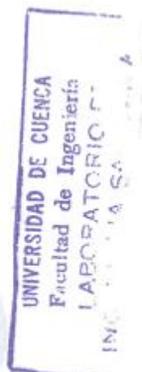
## DETERMINACION DE SOLIDOS

Fecha: Jueves 28 de agosto del 2014

| PARAMETRO                     | SCENEDESMIUS | H1     | ESPECIE 3 | CHORELLA | ESPECIE 1 |
|-------------------------------|--------------|--------|-----------|----------|-----------|
| SOLIDOS TOTALES               | 940,00       | 560,00 | 933,33    | 266,67   | 526,67    |
| SOLIDOS TOTALES FIJOS         | 520,00       | 256,67 | 536,67    | 156,67   | 300,00    |
| SOLIDOS TOTALES VOLATILES     | 420,00       | 303,33 | 396,67    | 110,00   | 226,67    |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES   | 460,00       | 276,67 | 396,67    | 90,00    | 216,67    |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS FIJOS     | 40,00        | 36,67  | 53,33     | 30,00    | 33,33     |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS VOLATILES | 420,00       | 240,00 | 343,33    | 60,00    | 183,33    |
| SOLIDOS DISUELTOS TOTALES     | 480,00       | 283,33 | 536,67    | 176,67   | 310,00    |
| SOLIDOS DISUELTOS FIJOS       | 480,00       | 220,00 | 483,33    | 126,67   | 266,67    |
| SOLIDOS DISUELTOS VOLATILES   | 0,00         | 63,33  | 53,33     | 50,00    | 43,33     |

Responsable:

Dra. Guillermina Pauta C.  
QUIMICO-ANALISTA





**DETERMINACION DE SOLIDOS**

Fecha: Lunes 1 de Septiembre del 2014

| PARAMETRO                     | SCENEDESMUS | H1     | ESPECIE 3 | CHORELLA | ESPECIE 1 |
|-------------------------------|-------------|--------|-----------|----------|-----------|
| SOLIDOS TOTALES               | 1493,33     | 820,00 | 1363,33   | 353,33   | 713,33    |
| SOLIDOS TOTALES FIJOS         | 550,00      | 256,67 | 410,00    | 56,67    | 196,67    |
| SOLIDOS TOTALES VOLATILES     | 943,33      | 563,33 | 953,33    | 296,67   | 516,67    |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES   | 856,67      | 370,00 | 793,33    | 180,00   | 386,67    |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS FIJOS     | 33,33       | 6,67   | 33,33     | 0,00     | 23,33     |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS VOLATILES | 823,33      | 363,33 | 760,00    | 180,00   | 363,33    |
| SOLIDOS DISUELTOS TOTALES     | 636,67      | 450,00 | 570,00    | 173,33   | 326,67    |
| SOLIDOS DISUELTOS FIJOS       | 516,67      | 250,00 | 376,67    | 56,67    | 173,33    |
| SOLIDOS DISUELTOS VOLATILES   | 120,00      | 200,00 | 193,33    | 116,67   | 153,33    |

Responsable:

  
 Dra. Guillermina Pauta C.

QUIMICO-ANALISTA



**DETERMINACION DE SOLIDOS**

Fecha: Jueves 4 de Septiembre del 2014

| PARAMETRO                     | CHORELLA | ESPECIE 1 |
|-------------------------------|----------|-----------|
| SOLIDOS TOTALES               | 366,67   | 693,33    |
| SOLIDOS TOTALES FIJOS         | 76,67    | 210,00    |
| SOLIDOS TOTALES VOLATILES     | 290,00   | 483,33    |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES   | 216,67   | 440,00    |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS FIJOS     | 6,67     | 3,33      |
| SOLIDOS SUSPENDIDOS VOLATILES | 210,00   | 436,67    |
| SOLIDOS DISUELTOS TOTALES     | 150,00   | 253,33    |
| SOLIDOS DISUELTOS FIJOS       | 70,00    | 206,67    |
| SOLIDOS DISUELTOS VOLATILES   | 80,00    | 46,67     |

Responsable:

  
Dra. Guillermina Pauta C.  
QUIMICO-ANALISTA

UNIVERSIDAD DE CUENCA  
Facultad de Ingeniería  
LABORATORIO DE  
INGENIERIA SANITARIA

UNIVERSIDAD DE CUENCA  
desde 1867