

**EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE
LÍPIDOS DE LA MICROALGA *Chlorella sp* AISLADA DE AMBIENTES
DULCEACUÍCOLAS COLOMBIANOS A ESCALA DE LABORATORIO Y
PILOTO**

LUDDY PATRICIA NIETO ESTÉVEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
BUCARAMANGA
2009**

**EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE
LÍPIDOS DE LA MICROALGA *Chlorella sp* AISLADA DE AMBIENTES
DULCEACUÍCOLAS COLOMBIANOS A ESCALA DE LABORATORIO Y
PILOTO**

LUDDY PATRICIA NIETO ESTÉVEZ

**Trabajo de Grado para Optar el Título de Magíster en Ciencias Básicas
Biomédicas**

Directora

CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ PhD

Codirectora

ASTRID LORELY PIMIENTA RUEDA MSc

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
BUCARAMANGA
2009**

*A mis hijos que son el motor de mi
vida y a todos aquellos que siempre creen y
confían en mí*

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceros agradecimientos al Laboratorio de Biotecnología del Instituto Colombiano del Petróleo ICP - ECOPETROL S.A. porque ha sido el espacio en dónde se ha dado mi crecimiento profesional y en dónde he tenido la oportunidad de desarrollar habilidades y transmitir mis aprendizajes. Igualmente porque es una joya tecnológica en la que se desarrollan procesos valiosos para el avance del país y porque es el espacio que permitió el desarrollo experimental realizado. Agradezco especialmente a Astrid Pimienta líder del Laboratorio por su apoyo y permanente acompañamiento y por enseñarme a pensar con claridad entre las dificultades.

A la Doctora Claudia Ortiz López directora del proyecto por su asesoría e invaluable aporte técnico y por acompañarme a lo largo de éste proceso con sabiduría y perseverancia.

A mis hijos porque me han hecho mejor persona a lo largo del tiempo y me enseñan diariamente sobre la paciencia, el amor y la paz. Espero que mi ejemplo les permita lograr todo aquello que hubiera querido para mí, son el mayor regalo que me dio la vida.

A mis amigos del alma, a Mary Lupe por su espíritu alegre y afectuoso, por enseñarme el valor del tiempo compartido y por enseñarme a pensar en mí, por su claridad mental y su motivación permanente, nunca tendré palabras para agradecer su apoyo.

A mi familia por darme el carácter y ayudarme a forjar mi destino y finalmente a todos aquellos que aun cuando no menciono saben que son fundamentales en mi desempeño y a quienes siempre he agradecido su apoyo y amistad.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	5
1.1 OBJETIVOS GENERALES	5
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 CONCEPTOS GENERALES DE LAS ALGAS	6
2.2 ALGAS VERDES O CHLOROPHYCEAE	9
2.3 EL GENERO <i>Chlorella</i>	11
2.4 SISTEMA DE CULTIVO DE MICROALGAS	15
2.5 AISLAMIENTO DE CULTIVOS MICROALGALES	15
2.5.1 Factores que afectan el aislamiento.	17
2.6 TÉCNICAS DE MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CULTIVOS ALGALES.	18
2.7 DINÁMICA DEL CRECIMIENTO ALGAL	20
2.8 FACTORES FÍSICOQUÍMICOS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS	21
2.8.1 Composición del Medio de Cultivo.	21
2.8.2 Concentración del ión hidrógeno.	22
2.8.3 Temperatura.	23
2.9 FACTORES NUTRICIONALES PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS	25
2.9.1 Carbono.	25
2.9.2 Nitrógeno	26
2.9.3 Fósforo	27
2.10 PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS MICROALGALES Y TRANSFORMACIÓN A BIOCOMBUSTIBLES	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 MATERIALES	33
3.1.1 Microorganismo	33
3.1.2 Medios de Cultivo	33
3.1.2.1 Medio para aislamiento de microalgas	33

	Pág.
3.1.2.2 Medios para el mantenimiento y conservación de las microalgas	33
3.1.2.3 Medios utilizados para los estudios de cinética de crecimiento y producción de lípidos	34
3.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA	34
3.2.1 Recuento Celular en cámara de Neubauer (Schoen, 1988)	34
3.2.2 Determinación de la concentración celular por Densidad Óptica (Arredondo y Voltolina, 2007)	36
3.2.3 Determinación de Biomasa de microalgas por curva patrón de peso seco (Sorokin, 1973).	36
3.2.4 Determinación del contenido de lípidos (Bligh y Dyer, 1959)	37
3.2.4.1 Procedimiento de Extracción de lípidos totales (método de Bligh y Dyer (1959) adaptado para la extracción de lípidos de microalgas.	37
3.2.4.2 Procedimiento para la Cuantificación de lípidos: Método de calcinación para la determinación de lípidos totales Marsh y Weinstein (1966).	38
3.2.4.3 Procedimiento para la elaboración de la curva de calibración para determinación de lípidos totales en cepas de microalgas.	39
3.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	40
3.3.1 Metodologías para el Aislamiento, mantenimiento, conservación y manejo de inóculos de cepas de <i>Chlorella</i> sp	42
3.3.1.1 Toma de muestra de aislamiento de cultivos uniales de microalgas del género <i>Chlorella</i> sp.	42
3.3.1.2 Mantenimiento en subcultivo de las cepas aisladas	43
3.3.1.3 Producción de inóculos	45
3.3.2 Cinética de crecimiento y producción de lípidos a partir de <i>Chlorella</i> sp	45
3.3.2.1 Cinética de crecimiento para la cepa patrón de <i>Chlorella vulgaris</i>	45
3.3.2.2 Estudio de selección de la mejor cepa nativa de <i>Chlorella</i> sp	46
3.3.3 Evaluación de variables críticas de proceso con la cepa <i>Chlorella</i> sp Ch4	47
3.3.3.1 Selección del medio de cultivo para el crecimiento y producción de lípidos utilizando la cepa <i>Chlorella</i> sp Ch4	47
3.3.3.2 Evaluación de la modalidad del pH utilizando la cepa <i>Chlorella</i> sp Ch4	48
3.3.3.3 Evaluación del efecto de la urea y el nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de lípidos de <i>Chlorella</i> sp Ch4	48

	Pág.
3.3.3.4 Evaluación de la relación Nitrógeno: Fósforo y su influencia en el crecimiento y producción de lípidos <i>Chlorella</i> sp Ch4	49
3.3.3.5 Estudio del efecto de agua residual en la cinética de crecimiento y producción de lípidos de <i>Chlorella</i> sp Ch4	49
3.3.3.6 Análisis estadístico de los datos	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1 AISLAMIENTO DE MICROALGAS DEL GENERO <i>Chlorella</i> SP.	51
4.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA LA CEPA PATRON DE <i>Chlorella vulgaris</i>	53
4.3 ESTUDIO DE SELECCIÓN DE LA MEJOR CEPA NATIVA DE <i>Chlorella</i> sp.	56
4.4 EVALUACIÓN DE VARIABLES CRÍTICAS DE PROCESO CON LA CEPA <i>Chlorella</i> Ch4.	64
4.4.1 Selección del medio de cultivo para el crecimiento y producción de lípidos utilizando la cepa <i>Chlorella</i> sp Ch4	64
4.4.2 Evaluación de la modalidad del pH utilizando la cepa <i>Chlorella</i> sp Ch4	69
4.4.3 Evaluación del efecto de la urea y el nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de lípidos por <i>Chlorella</i> sp Ch4	75
4.4.4 Evaluación de la relación de Nitrógeno: Fósforo y su influencia en el crecimiento y producción de lípidos de <i>Chlorella</i> sp Ch4	79
4.4.5 Estudio del efecto de agua residual en la cinética de crecimiento y producción de lípidos de <i>Chlorella</i> sp Ch4	86
5. CONCLUSIONES	97
6. BIBLIOGRAFÍA	99
ANEXOS	112

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Contenido de lípidos de algunas microalgas	31
Tabal 2.	Composición bioquímica de las algas, expresada en una base de materia seca	31
Tabla 3.	Parámetros Cinéticos considerados para la evaluación de las cinéticas de crecimiento y producción con cepas de <i>Chlorella</i> sp.	46
Tabla 4.	Ubicación geográfica de los puntos de muestreo para el aislamiento de microalgas	51
Tabla 5.	Cepas de <i>Chlorella</i> sp aisladas	52
Tabla 6.	Parámetros cinéticos del estudio de selección de la mejor cepa nativa de <i>Chlorella</i> sp	62
Tabla 7.	Parámetros cinéticos obtenidos en la evaluación de medios de cultivo con la cepa de <i>Chlorella</i> Ch4 en reactores de 12 litros.	68
Tabla 8.	Parámetros cinéticos obtenidos en la evaluación de medios de cultivo con la cepa de <i>Chlorella</i> Ch4 a 7 días de crecimiento en columnas aireadas de 12 litros.	74
Tabla 9.	Parámetros cinéticos obtenidos en la evaluación de urea y Nitrato como fuentes de nitrógeno con la cepa de <i>Chlorella</i> Ch4 a 7 días de crecimiento en columnas aireadas de 12 litros.	78
Tabla 10,	Parámetros cinéticos obtenidos en la evaluación en medio Bristol de cuatro relaciones N:P con la cepa de <i>Chlorella</i> Ch4. . Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.	84
Tabla 11,	Parámetros cinéticos con la cepa de <i>Chlorella</i> Ch4 en medio Bristol con agua PTAR al 10% V/V y medio Bristol. Experiencias con <i>Chlorella</i> sp Ch4, Reactor cónico de 250L con 200 L de medio, 25±2 °C, aireación a 20 psi, luz constante entre 4000 y 5000 lux	91
Tabla 12.	Resultados del análisis fisicoquímico del agua de PTAR antes y después del crecimiento de <i>Chlorella</i> sp Ch4 durante 14 días. Se incluyen los valores de Decreto 1594-1984 para aguas de vertimiento.	95

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diferentes organizaciones morfológicas en las algas verdes (Brodie and Lewis, 2007)	10
Figura 2. Cultivos de <i>Chlorella</i> sp a partir de muestras de Ciénaga Los Patos Cicuco(a) y Caño La Cira (b)	12
Figura 3. <i>Chlorella</i> sp aislada de la Ciénaga Miramar	12
Figura 4. Aislamiento primario en cultivo mixto	52
Figura 5. Cepas aisladas de <i>Scenedesmus</i> sp (a) y <i>Chlorella</i> sp (b) y (c).	53
Figura 6. 6. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> (UAM) en Medio Bristol. Volumen 1,25L, 25±2 °C, pH 6, 5, HR 63±3%, aire por burbujeo, luz 2000 - 2500 lux	54
Figura 7. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch1, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 2500 lux.	56
Figura 8. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch2, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2 000 y 2500 lux.	57
Figura 9. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch2, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2 000 y 2500 lux.	57
Figurta 10. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2 000 y 2500 lux.	58
Figura 11. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch5, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2 000 y 2500 lux.	58

		Pág.
Figura 12.	Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch6, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2 000 y 2500 lux.	59
Figura 13.	Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch7, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2 000 y 2500 lux.	59
Figura 14	Principales parámetros cinéticos para las cepas de <i>Chlorella</i> sp en el estudio de selección de la mejor cepa nativa. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch7, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 2500 lux.	63
Figura 15	Cinética de crecimiento y producción de lípidos de <i>Chlorella</i> sp Ch4 en medio Bristol sin modificaciones Columnas aireadas de 12 L con 8L de medio, 25±2°C, HR 63±3%, aireación 1 vvm, luz constante 2000 - 4000 lux	64
Figura 16	Cinética de crecimiento y producción de lípidos de <i>Chlorella</i> sp Ch4 en medio BG-11,Columnas aireadas de 12 L con 8L de medio, 25±2°C, HR 63±3%, aireación 1 vvm, luz constante 2000 - 4000 lux.	65
Figura 17.	Cinética de crecimiento y producción de lípidos de <i>Chlorella</i> sp Ch4 en medio Bristol 2X .Columnas aireadas de 12 L con 8L de medio, 25±2°C, HR 63±3%, aireación 1 vvm, luz constante 2000 - 4000 lux.	65
Figura 18	Cinética de crecimiento y producción de lípidos de <i>Chlorella</i> sp Ch4 en medio AL .Columnas aireadas de 12 L con 8L de medio, 25±2°C, HR 63±3%, aireación 1 vvm, luz constante 2000 - 4000 lux.	66
Figura 19.	Comparativo de parámetros cinéticos con la cepa <i>Chlorella</i> sp Ch4 en los medios de cultivo evaluados. Columnas aireadas de 12 L con 8L de medio, 25±2°C, HR 63±3%, aireación 1 vvm, luz constante 2000 - 4000 lux.	68
Figura 20,	Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol a pH inicial de 6,5. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.	70

		Pág.
Figura 21.	Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol a pH inicial de 7,5 . Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.	79
Figura 22.	Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol a pH inicial de 8,5. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.	80
Figura 23.	Cinética control de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol a pH constante de 8,0, Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.	80
Figura 24.	Comparativo de parámetros cinéticos (Biomasa y lípidos) de <i>Chlorella</i> sp Ch4 a diferentes condiciones iniciales de pH. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4 000 lux.	83
Figura 25.	Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol con Urea como fuente de nitrógeno. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 l ux.	84
Figura 26.	Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol con Nitrato como fuente de nitrógeno. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 l ux.	85
Figura 27.	Comparativo de parámetros cinéticos (Biomasa y lípidos) de <i>Chlorella</i> sp Ch4 con dos fuentes de nitrógeno (urea y nitrato). Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 200 0 y 4000 lux.	87
Figura 28.	Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de <i>Chlorella</i> sp Ch4 en Medio Bristol con relación N:P 10:1, Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entr e 2000 y 4000 lux.	90

		Pág.
Figura 29.	Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de <i>Chlorella</i> sp Ch4 en Medio Bristol con relación N:P 30:1 Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux	90
Figura 30,	Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de <i>Chlorella</i> sp Ch4 en Medio Bristol con relación N:P 50:1 Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.	91
Figura 31.	Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de <i>Chlorella</i> sp Ch4 en Medio Bristol con relación N:P 80:1, Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.	91
Figura 32.	Biomasa y Producción de Lípidos totales del Control de <i>Chlorella</i> sp Ch4 en Medio Bristol Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.	92
Figura 33.	Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de <i>Chlorella</i> sp Ch4 evaluadas en Medio Bristol para cuatro relaciones N:P evaluadas. Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.	95
Figura 34.	Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de <i>Chlorella</i> sp Ch4 en Agua PTAR al 10% Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 250L conteniendo 200 L de medio, 25±2 °C, aireación a 20 psi, luz constante entre 4000 y 5000 lux.	97
Figura 35.	Biomasa y Producción de Lípidos totales de <i>Chlorella</i> sp Ch4 en medio Bristol Experiencia con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 250L conteniendo 200 L de medio, 25±2 °C, aireación a 20 psi, luz constante entre 4000 y 5000 lux.	97
Figura 36.	Comparativo de parámetros cinéticos entre los medios Bristol con PTAR al 10% V/V para la cepa de <i>Chlorella</i> sp y Medio Bristol Experiencias con <i>Chlorella</i> sp Ch4, columna de 250L con 200 L de medio, 25±2 °C, aireación a 20 psi, luz constante entre 4000 y 5000 lux	101

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE LA MICROALGA *Chlorella sp* AISLADA DE AMBIENTES DULCEACUÍCOLAS COLOMBIANOS A ESCALA DE LABORATORIO Y PILOTO*

AUTOR: NIETO, Luddy ;ORTIZ, Claudia; PIMIENTA, Astrid*****

PALABRAS CLAVES: *Chlorella*, lípidos, microalga, biodiesel

Teniendo en cuenta el potencial uso de las microalgas para la producción de biocombustibles, se desarrolló un estudio dirigido hacia la estandarización de un proceso productivo de lípidos a partir de microalgas nativas. Se aislaron siete cepas de *Chlorella sp*. Las cepas fueron cultivadas en el medio de referencia Bristol en reactores de 2 L, temperatura 25 ± 2 °C, pH 6,5, humedad relativa (HR) $63\pm 3\%$, aire por burbujeo e intensidad de luz 2000 - 2500 lux.

A partir de las siete cepas nativas, se seleccionó la *Chlorella sp* Ch4, como la mejor productora con 0,968 g/l de biomasa, tg de 0,7632 días, 18,88 % de lípidos y una productividad específica de 0,0210 g lípido/ g cél.día. El medio Bristol, fue seleccionado como el mejor medio productor. Los estudios del efecto de pH, fuente de nitrógeno y relación nitrógeno:fósforo, fueron realizados en columna de 12 L. El pH más adecuado para iniciar la fermentación de *Chlorella sp* Ch4 estuvo entre 7,5 y 8,5. Se evaluaron urea y nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno sin diferencias significativas en cuanto a la producción de biomasa y lípidos. La relación de nitrógeno:fósforo 10:1, fue la más favorable para el crecimiento de la microalga seleccionada y la producción de lípidos.

Se estudió el efecto del agua de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) del Complejo petrolero de Barrancabermeja. Se utilizó medio Bristol conteniendo 10 % de agua PTAR y una relación N:P, 240:1, pH inicial 7,5, en reactor cónico de 220 L. Se obtuvieron 1,588 g/l de biomasa, un tg de 0,5242 días, una concentración de lípidos de 24.67 % y productividad específica de 0,0194 g lípido/ g cél, día, valores que resultan muy promisorios para un escalado a nivel industrial del proceso.

* Proyecto de Grado para optar por el título de Máster en Ciencias Básicas Biomédicas.

** Facultad de Salud, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Director

*** ECOPETROL S.A., Instituto Colombiano del Petróleo, Laboratorio de Biotecnología, Codirector

SUMMARY

TITLE: EVALUATION OF THE CONDITIONS OF CULTURE AND PRODUCTION OF LIPIDS OF MICROALGAE *Chlorella* sp ISOLATED FROM FRESHWATER ENVIRONMENTS IN COLOMBIA AT LABORATORY AND PILOT SCALE *

AUTHOR: NIETO, Luddy ;ORTIZ, Claudia; PIMIENTA, Astrid*****

KEY WORDS: *Chlorella*, lipids, microalgae, biodiesel

Taking into account the potential use of microalgae in the biofuels production, a directed study was developed towards standardization of a lipids productive process from the native microalgae. Seven *Chlorella* sp strains were isolated. The strains were cultivated in the Bristol reference means in reactors of 2 L, temperature 25 ± 2 °C, pH 6.5, relatively humidity (HR) $63 \pm 3\%$, bubbling air and light intensity 2000 - 2500 lux.

From the seven native strains, *Chlorella* sp Ch4 was chosen like the best biomass and lipids producer with 0.968 g/l of biomass, tg 0.7632 days, 18.88% of lipids and a specific productivity of 0.0210 g lipid/ g cel.day. The Bristol means was selected like the best producer means. The studies of the pH effect, nitrogen source and relationship nitrogen: phosphorus were held in reactor of column of 12 L. The most suitable pH to initiate the microalgae *Chlorella* sp Ch4 fermentation was established between 7.5 and 8.5. The urea and sodium nitrate were evaluated like nitrogen source, without any significant differences regarding the biomass and lipids production. It was found that the nitrogen:phosphorus relationship, 10:1, was the most favorable to the selected microalgae growth and the lipids production.

Was studied the effect of presence of water from the industrial waste plant treatment from Oil Complex (PTAR) in Barrancabermeja in means of culture. Bristol means was used containing 10% of PTAR water and N:P, 240:1, initial pH 7.5, in conic reactor of 220L. A concentration of biomass 1.588g/l was achieved, a tg of 0.5242 days, a lipids concentration of 24.67% and a specific productivity of 0.0194 g lipid / g cel. day. Those values are very promising to an industrial level escalation of the process.

*Thesis of grade of Master in Basic Biomedical Sciences

**Faculty of Health, Bacteriology and Clinic Laboratory, Thesis supervisor.

*** ECOPETROL S.A., Colombian Petroleum Institute, Biotechnology Laboratory. Thesis supervisor

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, la investigación biotecnológica se ha centrado en la búsqueda de alternativas para disminuir la dependencia del combustible de origen fósil a través de la obtención de formas alternas de energía. Diseñar procesos que combinen estrategias de generación de energía sostenible, es el punto clave de los desarrollos científicos en la mayoría de países industrializados, problemática a la que no es ajena América Latina y por ende Colombia.

Uno de los principales retos para el desarrollo de estos procesos a escala industrial y que garantizarían su sostenibilidad en el tiempo, es la apropiada utilización de los recursos biológicos disponibles ya que la competencia con los cultivos agrícolas por la misma materia prima y el aumento de la población mundial, podrían conducir a una escasez de insumos o al incremento en los precios de los alimentos con las consecuencias que se derivarían de ello. Sumado a lo anterior se debe tener en cuenta la cantidad de recursos necesarios para su generación, lo que hace que la producción y cobertura de los biocombustibles convencionales que se obtienen en la actualidad como el etanol a partir de caña de azúcar o el biodiesel a partir de aceite de palma, no sea óptima para satisfacer la creciente demanda (Chisty Y, 2007, Berndes *et al.*, 2003)

Con base en lo anterior y considerando a su vez que las reservas mundiales de combustibles fósiles han decrecido y los niveles de dióxido de carbono han afectando los ecosistemas acelerando el cambio climático, existe la necesidad urgente de obtener nuevas formas renovables de combustibles con emisiones netas de carbono reducidas. Sin embargo, los requerimientos en cuanto a tierra y agua dulce de los cultivos actualmente utilizados para producción de los biocombustibles convencionales compiten con los de la agricultura y la

biodiversidad de los diferentes países; lo que se requiere son plantas o biomasa de crecimiento rápido y fácil procesamiento, que se desarrollen en entornos no útiles para la agricultura ni la conservación de especies. (Fischer G, 2001; Lazarus *et al.*, 1994)

Las microalgas pueden ser parte de la solución ya que crecen rápidamente, no compiten con el renglón económico de la agricultura en cuanto a recursos de agua dulce o tierra, son biodegradables y se pueden cultivar en distintos tipos de ecosistemas acuáticos. Además de lo anterior, comparadas con otras biomásas tienen una mayor eficiencia fotosintética que, por ejemplo, los árboles y es posible utilizar industrialmente su capacidad para fijar CO₂ y luego de su crecimiento, transformar la biomasa algal o sus lípidos en aceites para refinación por métodos químicos o lograr el aprovechamiento de sus subproductos (biomasa enriquecida) en sistemas de generación de energía por vías termoquímicas como pirólisis y gasificación. (Yang *et al.*, 2004).

Las microalgas están compuestas básicamente por proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y ácidos grasos. Los ácidos grasos se encuentran en membranas, en productos de almacenamiento, metabolitos, etc. El porcentaje de ácidos grasos varía según la especie, aunque hay especies cuyos ácidos grasos representan hasta un 60% de su peso seco (Sheehan *et al.*, 1998). Estos son los ácidos grasos que luego pueden ser transformados en biocombustibles en un proceso renovable que utiliza energía solar. Para la producción de biocombustibles, se buscan preferiblemente algas resistentes a condiciones medioambientales adversas, que contengan un alto contenido en lípidos y que sean fácilmente cultivables (Sheehan *et al.*, 1998 *ibid*).

El éxito de la tecnología de producción de biocombustibles a partir de biomasa algal depende de la obtención de organismos nativos a partir de muestras naturales con metabolismo adaptable a condiciones diversas (salinidad del agua,

presencia de sustancias inhibitorias, condiciones de eutroficación, etc) (Chisti, 2007), de la estandarización de condiciones de cultivo óptimas para rápido crecimiento y altas productividades en lípidos lo que da un balance en términos económicos y ambientales, altamente favorable a esta tecnología.

Con los resultados del Programa de especies acuáticas (ASP), durante la década de los ochenta, el Instituto de Energías Renovables de los Estados Unidos (NREL) evaluó la factibilidad de los cultivos algales para producción de biocombustibles, estableciendo que los grupos con mayor posibilidad de escalado a nivel industrial para la producción de lípidos eran algunos géneros de las clases Chlorophyceae y Bacillariophyceae (Sheehan *et al.*, 1998 op. cit.).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el presente proyecto de investigación se orientó hacia el aislamiento de microalgas nativas del género *Chlorella* (clase Chlorophyceae), a partir de muestras de cuerpos de agua contaminados y/o impactados por diversas actividades y la evaluación del efecto del medio de cultivo utilizado a escala de laboratorio.

La microalga seleccionada para este estudio fue *Chlorella*, la cual ha sido evaluada y empleada en varias aplicaciones prácticas en agricultura y biotecnología por su gran versatilidad y adaptabilidad. Se han utilizado diferentes especies de éste género principalmente para la producción de nutraceuticos y para la oxidación de aguas residuales (Kessler, 1984; Benemann *et al.*, 1982) en razón a su capacidad para absorber o remover cantidades significativas de nitrógeno y fósforo durante su crecimiento, absorber metales y acelerar la inactivación de bacterias patógenas (Tam *et al.*, 1989; Abalde *et al.* 1995; Lau *et al.*, 1995, Tam *et al.*, 2001), entre otros usos.

En Colombia, *Chlorella* es la cepa predominante en los ambientes acuáticos altamente contaminados, lo cual es un indicador de su potencial para el escalado

en estas aguas y su posible integración a procesos industriales que liberan CO₂ al medio ambiente (Ecopetrol ICP Laboratorio de Biotecnología, Informes 206-2008 área de Bioensayos). Lo anterior hace que la investigación de esta microalga sobre su capacidad para acumular lípidos sea de gran relevancia para el desarrollo del país en la generación de alternativas biotecnológicas para producción de biocombustibles. Este proyecto de investigación sienta las bases para el estudio de las microalgas en cuanto a aislamiento, cultivo, conservación, evaluación y escalado para posibles procesos industriales.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

De la tesis el estudio del efecto de las condiciones de cultivo de la microalga *Chlorella sp* aislada de ambientes dulceacuícolas colombianos, sobre el crecimiento y producción de lípidos, a escala de laboratorio.

Mediante la realización de este estudio se espera comprobar la **hipótesis de factibilidad** de la producción de lípidos en una cepa de *Chlorella sp* nativa, utilizando aguas residuales de la Planta de Tratamiento de la Refinería Gerencia Barrancabermeja (PTAR GRB) como sustrato tomando como referencia los medios estándar de cultivo.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Seleccionar una cepa de *Chlorella sp* a partir de cuerpos de agua lénticos y establecer sus condiciones de crecimiento y producción de lípidos.
- Evaluar el crecimiento de *Chlorella sp* y la producción de lípidos a nivel de reactor de laboratorio.
- Evaluar el efecto del agua de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR GRB) sobre el crecimiento y producción de lípidos de la microalga *Chlorella sp* aislada, a escala piloto.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CONCEPTOS GENERALES DE LAS ALGAS

Las algas constituyen la variedad de organismos fotosintéticos más primitivos. Se encuentran prácticamente en todos los ambientes de la tierra y se conocen desde niveles unicelulares hasta organismos multicelulares de gran complejidad (Wiessner *et al.*, 1995). Su función está bien reconocida por ser los mayores productores primarios en la tierra. No solo proveen alimento a los organismos consumidores, sino que también soportan la vida por su producción de oxígeno (Andersen, 1996).

Los microorganismos fotosintéticos se agruparon en principio en dos categorías: bacterias fotosintéticas y microalgas. Las bacterias fotosintéticas realizan fotosíntesis anoxigénica y poseen bacterioclorofila, químicamente diferente de la clorofila *a* presente en los otros organismos fotosintéticos (algas y plantas superiores). Las algas verde-azules ocupan una posición intermedia entre las bacterias fotosintéticas y las algas eucariotas no poseen bacterioclorofila, sino clorofila *a* y realizan fotosíntesis oxigénica. Sin embargo, su estructura celular procariota (pared celular, ribosomas y ácido nucleico), las sitúa taxonómicamente dentro del grupo de las bacterias (Reino Procaryotae), con la denominación de cianobacterias (Staley *et al.*, 1989)

En un sentido amplio y desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila *a* y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. En este contexto, las cianobacterias o algas verde-azules, procariotes, se han considerado tradicionalmente dentro del grupo de las microalgas (Dodge, 1973). Por lo tanto, el término microalgas no tiene sentido taxonómico alguno y dentro del mismo, se

incluyen organismos con dos tipos celulares distintos: cianobacterias que tienen estructura celular procariota y las restantes microalgas con estructura celular eucariota (Brodie and Lewis, 2007).

Las microalgas eucariotas, a pesar de la enorme variedad en forma, organización y tamaño, se caracterizan por ser microorganismos unicelulares que poseen núcleo y todos los orgánulos propios de las células eucariotas (Dodge, 1973 op. cit.; Berner, 1993). La reproducción es generalmente por fisión binaria, con tiempos de duplicación de una hora o menos para los procariotas (cianobacterias), pero de 8 a 24 horas para las eucariotas. (Taylor, 1980). Muchas tienden a dividirse en un momento particular del día o la noche (Sournia, 1974). Las especies que se dividen durante el periodo de oscuridad sinterizan el material celular durante el periodo de luz, mientras que en la fase de oscuridad llevan a cabo diferentes reacciones relacionadas con la división celular (Taylor, 1980 op. cit.).

La reproducción sexual tiene lugar con una frecuencia variable en las microalgas, aunque siempre es menos frecuente que la reproducción asexual (Taylor, 1980 op. cit.). Numerosas especies microalgales son capaces de producir formas latentes, además de los acinetos de cianobacterias que les permiten sobrevivir durante periodos desfavorables. Estos quistes pueden formarse por procesos sexuales o asexuales y pueden ser de más de un tipo durante el ciclo vital (Hollibaugh *et al.*, 1981)

No hay consenso en cuanto a la clasificación y organización de las microalgas, tan solo se reconoce que se trata de organismos con clorofila que carecen de estructuras reproductivas y existen claves para clasificarlas (Brodie and Lewis, 2007). Existen sin número de revisiones en cuanto a la clasificación de las algas y ésta varía de acuerdo con los caracteres que sean utilizados, aumentando o reduciendo el número de clases conocidas. Hoy en día con el avance de nuevas

técnicas de observación y los adelantos de la genética y la biología molecular, estas clasificaciones irán siendo más precisas. (Brodie and Lewis, 2007 op. cit.).

Las microalgas se han catalogado en una variedad de clases. Principalmente se distinguen por su pigmentación, el ciclo básico de vida y estructura celular. Las cuatro clases más importantes, en términos de abundancia, son las siguientes (Sheehan *et al.*, 1998 op. cit.; Lee, 2008):

Las diatomeas (Bacillariophyceae) dominan el fitoplancton de los océanos, pero también se encuentran en aguas frescas y salobres (Sheehan *et al.*, 1998 *ibid*). Se sabe que existen aproximadamente 100,000 especies y que contienen sílice (Si) polimerizado en sus paredes celulares (Lee, 2008 op. cit.). Todas las células almacenan carbono en una variedad de formas. Las diatomeas almacenan el carbono en forma de aceites naturales o como un polímero de carbohidratos conocidos como *chrysolaminarin* (Lee, 2008 *ibid*).

Las algas verdes (Chlorophyceae) son abundantes, especialmente en agua dulce. Pueden encontrarse como células individuales o como colonias (Kirk and Kirk, 1986). Son las progenitoras evolucionarias de las plantas modernas, su principal forma de almacenamiento es almidón y aceites (Egan and Trainor, 1989).

Las algas azul-verdes (Cyanophyceae), Están más relacionadas con las bacterias en cuanto a su estructura. Estas algas desempeñan un papel importante en la fijación de nitrógeno de la atmósfera (Schutz *et al.*, 2007). Hay aproximadamente 2000 especies conocidas y se encuentran en una variedad de hábitat (Lee, 2008 op. cit.).

Las algas doradas (Chrysophyceae). Este grupo de algas es similar a las diatomeas. Tienen más complejos los sistemas de pigmentación, y pueden aparecer de color amarillo, marrón o color naranja (Andersen and Mulkey, 1983).

Aproximadamente 1000 especies se sabe que existen, principalmente en sistemas de agua dulce (Sheehan *et al.*, 1998 op. cit.). Su nutrición puede ser fototrófica, fagotrófica o mixotrófica (organismos fotosintéticos capaces de consumir partículas y moléculas del medio) (Zhang and Watanabe, 2001).

Las algas hacen parte de una comunidad complejamente diversa pero definida por su papel ecológico: la productividad primaria de los ecosistemas acuáticos. Por su amplia distribución son consideradas cosmopolitas y colonizadoras de una alta diversidad de hábitats, creciendo de manera natural y ajustando sus requerimientos a las variables ambientales específicas del sistema donde se desarrollan (De la Noue and De Paw, 1988).

Las algas son una de las fuentes de recursos naturales más importantes en la tierra. Contribuyen con aproximadamente el 50% de la actividad fotosintética (Wiessner *et al.*, 1995) y forman la base de la cadena alimenticia de más del 70% de la biomasa mundial (Andersen, 1996 op. cit.). Las algas han adaptado exitosamente su metabolismo para ocupar hábitats que van desde regiones polares hasta arrecifes coralinos (Brodie and Lewis, 2007 op. cit.). La habilidad de las algas para resistir el estrés medioambiental está ligada a su capacidad para producir gran cantidad de metabolitos secundarios con alto valor biotecnológico útiles en programas de acuicultura (Wikfors, 2001), salud e industrias alimenticias (Andersen, 1996 op. cit.).

2.2. ALGAS VERDES O CHLOROPHYCEAE

Las algas verdes son eucariotas fotosintéticos caracterizados por la presencia de cloroplastos con una envoltura de dos membranas, tilacoides apilados y clorofila *a* y *b*, son incoloras, pero las células contienen leucoplastos, los cuales secundariamente pierden sus pigmentos (Wang *et al.*, 2003). Todas las algas verdes producen almidón como la principal forma de reserva de polisacáridos, el

cual está depositado dentro de los plástidos. Los plástidos fueron incorporados en un evento de endocitobiosis primario (endosimbiosis), por el cual una cianobacteria fue tomada por un hospedero eucariota incoloro (Keeling, 2004; Delwiche and Palmer, 1997; Delwiche, 1999;)

Las algas verdes son uno de los más diversos grupos de eucariotas, mostrando morfologías que van desde unicelulares flagelados, cocoides, ramificados o no ramificados, filamentosos hasta macrófitos multinucleados y taxa con tejidos parenquemáticos (Deason, 1983). (Figura 1). Están distribuidos en todo el mundo y se pueden encontrar en prácticamente todos los hábitat desde las regiones Ártica y Antártica hasta los océanos y lagos de agua dulce, así como desde suelos de clima templado hasta zonas áridas (Lee, 2008 op. cit.). Se encuentran también en diferentes simbiosis que incluyen líquenes, protozoos y foraminíferos, o como parásitos en plantas tropicales. Hay un estimado de al menos 600 géneros con 10,000 especies (Norton *et al.*, 1996), su edad estimada está entre 600 millones de años (Van den Hoek *et al.*, 1988) a 1.500 millones de años (Yoon *et al.*, 2004).

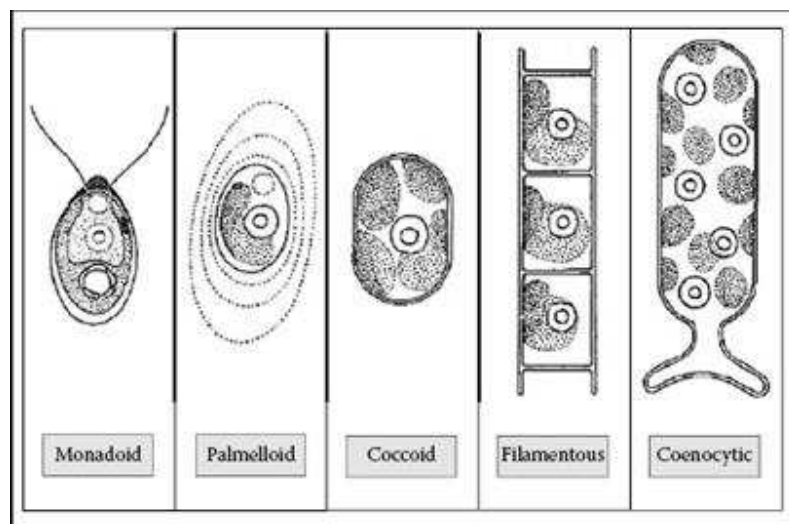


Figura 1. Diferentes organizaciones morfológicas en las algas verdes (Brodie and Lewis, 2007)

Las algas verdes o Chlorophyceae son predominantemente de agua dulce (Lee, 2008 op. cit.). Las pocas especies plantónicas unicelulares que existen en el agua de mar son miembros del género que tienen un número aún mucho mayor de especies de agua dulce, tales como el género *Chlamydomonas* (Kirk and Kirk, 1986 op. cit.). Las Chlorophyceae que tienen reproducción sexual conocida, producen un cigoto latente, con meiosis que usualmente se da cuando el cigoto germina (Kirk and Kirk, 1986 ibid). Las células se caracterizan por su movilidad radial o cercanamente radial, simetría externa y flagelo unido a la parte anterior final de la célula. Posibilidad de rizoplasto, estructura no multilaminada, comunes manchas en forma de ojos (Brodie and Lewis, 2007 op. cit.).

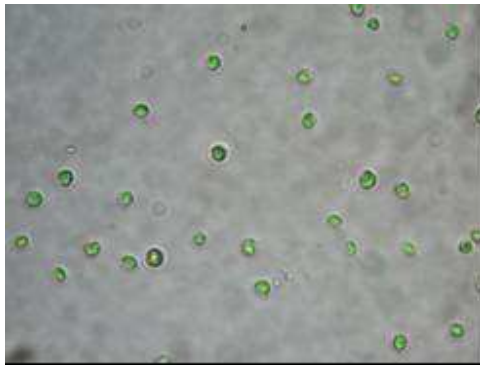
Las algas verdes tienen gran importancia debido a que se han reportado como productoras de lípidos y en consecuencia son fuentes promisorias de aceites precursores en la obtención de biodiesel. Dentro de este grupo hay mayor interés en las cepas de géneros *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Ankistrodesmus*, *Selenastrum*, *Nitzschia*, *Cosmarium*, *Chlorolobium*, *Westella* y *Monoraphidium*. (Chisti, 2007 op. cit.).

2.3 EL GÉNERO *Chlorella*

El nombre *Chlorella* proviene del griego chloros: verde; y del sufijo diminutivo latino ella: "pequeño". *Chlorella* es un género de algas verdes unicelulares pertenecientes al Filum *Chlorophyta* y orden Chlorococcales. Las células de *Chlorella* tienen forma esférica con cerca de 2-10 µm de diámetro y un cloroplasto en forma de copa, no tienen flagelo (Lee, 2008 op. cit.) (Figuras 2 y 3).

Figura 2. Cultivos de *Chlorella* sp a partir de muestras de Ciénaga Los Patos Cicuco(a) y Caño La Cira (b)

(a)



(b)

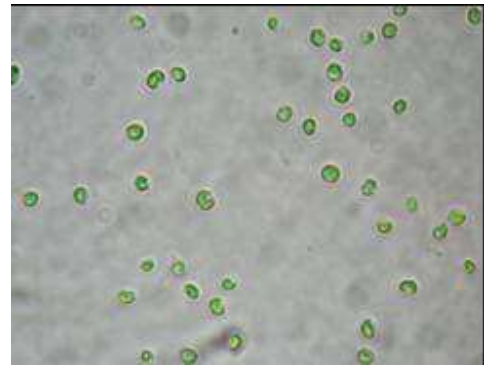


Figura 3. *Chlorella* sp aislada de la Ciénaga Miramar



Chlorella contiene los pigmentos verdes fotosintetizadores clorofila *a* y *b* en su cloroplasto. A través de la fotosíntesis se multiplica rápidamente requiriendo solo dióxido de carbono, agua, luz solar y pequeñas cantidades de minerales, para reproducirse (Dorling *et al.*, 1997).

Su reproducción es asexual y llevada a cabo produciendo autoesporas no móviles. Las especies de este género están ampliamente distribuidas tanto en aguas dulces, en el mar, aire y suelo (Brodie and Lewis, 2007 op. cit.).

La primera cepa del género *Chlorella* fue aislada por Beijerinck en 1890, Warburg en 1919 descubrió que cultivos puros de este microorganismo de rápido crecimiento podrían utilizarse como material de experimentación ideal para estudiar la fotosíntesis, reducción de nitratos, fisiología y bioquímica. Estos cultivos y los de otras especies o tipos de microalgas fueron estudiados por numerosos investigadores quienes observaron que bajo condiciones de cultivo adecuadas y especialmente a intensidad de luz de saturación eran mucho más productivos que las plantas superiores o las células fotoautotróficas aisladas de las mismas (Soeder, 1980). El bioquímico alemán Otto Heinrich Warburg recibió el Premio Nobel en Fisiología, de Medicina en 1931 por su estudio de la fotosíntesis en *Chlorella*. En 1961 Melvin Calvin de la Universidad de California recibe el Premio Nobel de Química por su estudio sobre los caminos de la asimilación del CO₂ en plantas usando a *Chlorella* como modelo.

Chlorella ha sido investigada intensivamente como posible fuente de nuevos alimentos para abastecer a la población mundial en aumento, en razón a que *Chlorella* produce poca celulosa u otros carbohidratos en el material de su pared y por lo tanto, es mucho más digerible que otras algas con altas cantidades de celulosa. Las células de *Chlorella* tomadas en fase exponencial contienen cerca de un 50% de proteínas, 5% de clorofila y un gran número de vitaminas (Spolaore *et al.*, 2006).

Se pueden obtener cantidades mucho mayores de biomasa por unidad de área con algas que con plantas superiores (Yamaguchi, 1997). Su producción a escala comercial está relativamente extendida en el sureste asiático, mientras que en otras zonas son más frecuentes otras especies (Soong, 1980). En Asia la producción comercial de *Chlorella* comienza en Taiwan en 1966 y las especies más utilizadas son *C. pyrenoidosa* y *C. ellipsoidea*. De esta especie se extrae un producto denominado Factor de crecimiento de las bacterias lácticas de *Chlorella*

(*Chlorella* Growth Factor, CGF) que mejora el crecimiento de las bacterias lácticas y que se distribuye en forma de polvo o como píldoras en el mercado alimenticio (Fogg, 1971). *Chlorella* También se ha utilizado como productora de almidón a nivel comercial y algunas cepas termofílicas obtenidas por procesos mutagénicos, presentan una elevada producción de luteína, pigmento utilizado en la industria alimenticia. (Abalde *et al.*, 1995 op.cit.).

Algunas especies del género *Chlorella* como por ejemplo *C.protothecoides*, pueden crecer fotoautotróficamente y/o heterotróficamente bajo diferentes condiciones de cultivo (Shi *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2002). El crecimiento heterotrófico de las cepas ha sido evaluado suplementando los medios de crecimiento con acetato, glucosa u otros componentes orgánicos como fuente de carbono, lo que ha resultado en incremento en la biomasa y alta concentración de lípidos en las células (Wu *et al.*, 1994; Endo *et al.*, 1977; Sansawa, 2004; Xu *et al.*, 2006).

Las cepas de *Chlorella* tienen un gran potencial para ser utilizadas como fuente para la producción de biodiesel debido a su rápido crecimiento y facilidad de cultivo. Las investigaciones se dirigen principalmente hacia las condiciones de proceso que permitan aumentar la producción de biomasa e inducir la acumulación de lípidos que son los precursores necesarios para la transformación en biodiesel (Wen *et al.*, 2002)

Las investigaciones relacionadas con el poder calorífico de cepas de *Chlorella* que crecen en medios con bajas concentraciones de nitrógeno, entre otras condiciones evaluadas, sugieren que las microalgas del género *Chlorella* podrían utilizarse para el reemplazo del diesel (Illman *et al.*, 2000). Hay reportes de la utilización de aceites transesterificados obtenidos a partir de *Chlorella* como combustible para impulsar motores diesel (Liu, Z., 2007 op. cit.). Se ha producido

biodiesel de alta calidad a partir de la microalga heterotrófica *C. protothecoides* (Xu *et al.*, 2006 op. cit.).

2.4 SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS

El desarrollo de las técnicas de cultivo algal tuvo su inicio con las investigaciones bacteriológicas hacia finales del siglo XIX, por lo que tanto la terminología como las técnicas de cultivo utilizadas actualmente, tienen su origen en los primeros trabajos bacteriológicos. M.W. Beijerinck (1851-1931) en Holanda fue probablemente el primero en obtener un aislamiento y cultivo de una cepa algal *C.vulgaris*, aislada en 1889 de una laguna eutroficada ubicada cerca de Delft, Holanda; hoy día existen cerca de once cepas originales de Beijerinck que son conservadas en colecciones. Estas incluyen diez cultivos de los géneros *Chlorella*, *Trebouxia* y *Oocystis marssonii* (Andersen, 2005 op. cit.)

2.5 AISLAMIENTO DE CULTIVOS MICROALGALES

Se han probado muchas especies de microalgas para aplicaciones comerciales, lo que ha implicado el desarrollo de métodos para su aislamiento y cultivo tanto en interiores como exteriores. Las microalgas marinas y las de agua dulce no son tóxicas y resultan relativamente fáciles de cultivar (Guillard, 1995).

Las cepas del género *Chlorella* se encuentran en una gran variedad de ambientes en los que pueden soportar una serie de condiciones particulares (Spolaore *et al.*, 2006 Op. cit.). Sin embargo, ese crecimiento particular en el ambiente no necesariamente significa que éstas sean las condiciones óptimas. En los primeros ensayos de aislamiento se deben emular dichas condiciones como punto de partida. Uno de los primeros pasos es el enriquecimiento general y/o el enriquecimiento selectivo; en el primero se pretende aumentar el número de microalgas presentes en la muestra mediante incubación en condiciones similares

al ambiente natural. En el segundo caso, se aprovecha este paso para eliminar especies que no son de interés para el investigador.

Las técnicas para el establecimiento de cultivos monoalgales para especies de morfología cocoide, filamentosa, cepas móviles o inmóvil, coloniales o cenobiales, son las mismas. A su vez, un primer paso previo al aislamiento requiere el establecimiento de cultivos de enriquecimiento, en donde se aplica el principio de selección natural a microescala, favoreciendo, mediante la manipulación de dicho medio, el crecimiento de las especies que se deseen aislar e inhibiendo las especies competidoras (Gonzalez *et al.*, 1995).

Como se mencionó anteriormente las técnicas de aislamiento corresponden a las técnicas bacteriológicas de rutina con muy pocas modificaciones. Se describen a continuación las tres técnicas básicas de aislamiento (Andersen, 2005 op. cit.).

▪ AISLAMIENTO POR PIPETEO Y LAVADO SUCESIVO

Útil para aislar especies unicelulares con tamaños mayores de 10μ , así como especies filamentosas y coloniales. La técnica permite trabajar con portaobjetos excavados o vidrios reloj en donde se coloca de 5 – 8 gotas de medio de cultivo en el caso de usar vidrio reloj o 3-4 gotas en el portaobjetos excavado. Posteriormente, se toma la muestra y se coloca 1 gota en la primera gota del medio de cultivo; en el caso de que la muestra posea una alta densidad algal de especies no deseadas, continuar la dilución sucesiva. Posteriormente, con la ayuda de una pipeta Pasteur “adelgazada” o de grosor adecuado, se procede a aislar la unidad algal de interés bajo estereoscopio.

Una vez obtenida la unidad microalgal, esta debe colocarse en un segundo vidrio reloj y proceda a trasladar a otro para continuar con el lavado. Finalmente, se

traslada una a una las unidades microalgales a un tubo de ensayo con el medio de cultivo apropiado.

- **AISLAMIENTO POR RAYADO EN AGAR**

Este procedimiento es recomendado para especies con tamaños inferiores a 10 μ de diámetro. El tiempo de crecimiento medio con condiciones adecuadas de luz es de 4-8 días. Una vez observado el desarrollo de colonias, se observa al estereoscopio para diferenciar los tipos de colonias y se procede a montar una placa para observación al microscopio (en cámara de flujo laminar). Si la colonia observada se encuentra unialgal, se procede a un segundo rayado en agar. Una vez se obtenga colonias unialgales, estas deben ser trasladadas a medio líquido.

- **AISLAMIENTO POR DILUCIÓN**

Técnica indicada para el aislamiento de cepas con tamaño inferior a 10 μ m provenientes de muestras con alta densidad microalgal. En esta técnica no se manipulan las cepas individualmente, solo se procede a realizar una serie de diluciones sucesivas a partir de la muestra original.

2.5.1 Factores que afectan el aislamiento. El aislamiento de microalgas en cultivo utilizando métodos tradicionales, comenzó con los trabajos de Beijerinck (1890) y Miquel (1890-1893). Algunas especies comúnmente predominantes, son fáciles de aislar y cultivar, mientras que otras son de difícil crecimiento, por lo que es común el que organismos de ambientes extremos o de hábitat inusuales sean menos abundantes en las colecciones de cultivos que los que provienen de aguas dulces, lagunas, suelos y medios costeros.

Por lo general el primer paso hacia el aislamiento exitoso de una especie algal es entender y recrear las condiciones naturales de su medio ambiente. Para algas

marinas, la temperatura y salinidad son importantes, para algas oceánicas la calidad del agua y la toxicidad de los metales son factores claves. Las cepas de aguas dulces obtenidas en épocas de verano o provenientes de climas ecuatoriales son menos sensibles a la temperatura, pero sí al pH y cambios en la alcalinidad. Las especies de zonas polares o climas fríos son sensibles a las temperaturas tibias (Falkowski and Raven, 1997).

Las algas de medios ácidos o hipersalinos requieren medios de cultivo especiales, pero para las algas terrestres, las condiciones medioambientales son las menos importantes. Para propósitos comerciales es preferible realizar el aislamiento a utilizar algas de otras fuentes ya que las especies locales estarán adaptadas a las condiciones de calidad del agua local y pueden comportarse mejor en cultivo masivo (Laing y Ayala, 1990).

Un segundo paso hacia el aislamiento exitoso involucra la eliminación de contaminantes, especialmente aquellos que pueden llegar a excluir a las especies objetivo. Los pasos finales requieren subcultivos continuos. Puede suceder que las especies en aislamiento mueran luego de algunos pases a medio de cultivo fresco, esto indica la carencia de algún elemento particular o componente orgánico en el medio. También puede ocurrir que los organismos comiencen a acumular material de desecho que llegue a ser tóxico y les cause la muerte. En la naturaleza, estos desechos son metabolizados por otros organismos, por ejemplo bacterias (Andersen, 2005 op. cit.).

2.6 TÉCNICAS DE MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CULTIVOS ALGALES.

Para el establecimiento de cultivos de microalgas en el laboratorio es necesario proporcionar las condiciones específicas y adecuadas para la especie en estudio, permitiendo finalmente su establecimiento en cultivos *in vitro*. (González *et al.*,

1995 op. cit.). El manejo y mantenimiento de los cultivos microalgales implican el diseño e implementación de protocolos para el mantenimiento, crecimiento, masificación, subcultivo y conservación de los organismos dependiendo del género, hábitat y características fisicoquímicas específicas.

La fase inicial de un cultivo algal implica la posterior conservación del organismo recuperado. Cualquier estrategia de conservación o mantenimiento debe garantizar la estabilidad a largo plazo de la morfología, fisiología y características genéticas de los organismos preservados. Muchos aislamientos algales se han mantenido exitosamente *ex situ* durante décadas (Day, 1998); sin embargo, para algunas cepas esto es problemático ya que las características morfológicas o fisiológicas pueden hacerse inestables ante condiciones prolongadas de cultivo *in vitro*. Estos cambios pueden incluir por ejemplo, alteración o pérdida de la composición normal de sus pigmentos (Warren *et al.*, 1997).

Al igual que para otros grupos de organismos, las dos técnicas de conservación básica a largo plazo son: el cultivo *in vitro* (por ejemplo, subcultivo seriado de rutina bajo condiciones medioambientales controladas) o aproximaciones que dependen de la remoción o limitación de agua como la liofilización y el almacenamiento a bajas o ultra bajas temperaturas (Kirsop y Doyle, 1991; Day y McLellan, 1995). Sin embargo, ni el secado ni el liofilizado se han utilizado en forma intensiva para preservar microalgas, debido a que los títulos por volumen de microorganismos luego de la preservación pueden ser muy bajos y tienden a disminuir luego del almacenamiento (Mallick, 1993).

La criopreservación ha sido adoptada por la mayoría de las colecciones de cultivos algales (Morris, 1978; Bodas *et al.*, 1995) y se tiene como el método de elección para almacenamientos de largo tiempo en las colecciones mundiales de microorganismos (Day *et al.*, 1997). Finalmente la estabilidad del material de referencia (microalga) al almacenamiento de largo tiempo es esencial para todos

los campos de la investigación Biotecnológica; los últimos desarrollos en biología molecular permiten hacer seguimiento a la estabilidad de los organismos bajo estas condiciones. Es el caso de la técnica de “*Amplified Fragment Length Polymorphism*” (AFLP) utilizada para hacer seguimiento genético a la cepa original *C. vulgaris* aislada por Beijerinck y que ha sido conservada en varias colecciones del mundo a lo largo de muchos años (Müller *et al.*, 2005).

2.7 DINÁMICA DEL CRECIMIENTO ALGAL

El crecimiento microalgal se rige por la ley del mínimo, es decir, el factor limitante del crecimiento es aquel que está presente en cantidades más próximas al mínimo crítico necesario para la microalga. Pese a que el concepto de factor limitante en términos generales se aplica a deficiencias de nutrientes químicos, este concepto se ha ampliado considerando que los parámetros ambientales podrían limitar el crecimiento por exceso. Los niveles máximos y mínimos de tolerancia definen los límites de un organismo a cualquier factor ambiental (Abalde *et al.*, 1995 op. cit.). Cuando una microalga tiene éxito en un ecosistema, se concluye que la especie es suficientemente flexible en sus requerimientos e interacciones y por lo tanto el medio ambiente es óptimo para ella (Darley, 1987).

La obtención de rendimientos apropiados en los cultivos microalgales depende tanto de la concentración celular como de la velocidad de crecimiento de las células en el medio de producción. Para obtener un cultivo de microalgas con crecimiento estable es necesario tener un inóculo viable, con el volumen y la concentración celular apropiada, se debe garantizar el adecuado suministro de macro y micronutrientes y las condiciones fisicoquímicas (temperatura, pH) y el suministro de energía apropiados. Es importante conocer las condiciones óptimas y los límites de tolerancia de una microalga para el mayor número de parámetros ya que a partir de allí se diseñan las modificaciones y se evalúan las mejoras obtenidas.

2.8 FACTORES FISICOQUÍMICOS PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

2.8.1. Composición del Medio de Cultivo. El objetivo fundamental de las estrategias de control y optimización de los cultivos microalgales está dirigido a la producción de altas concentraciones celulares y a garantizar la composición bioquímica de las microalgas cultivadas. Este control puede ser ejercido mediante la manipulación de factores físicos y químicos (luz, temperatura, salinidad, composición del medio de cultivo) que influyen en el metabolismo microalgal (Becker, 1994) y mediante la formulación de medios de cultivo química y económicamente apropiados (Andersen, 1996 op. cit.).

La modificación del medio de cultivo es un método ampliamente utilizado para incrementar la producción de biomasa o variar su composición (De paw *et al.*, 1983). La mayor parte de los estudios han utilizado la estrategia de la modificación cuantitativa de los nutrientes suministrados a partir de medios base descritos en la literatura, Así, se han obtenido mejoras en la productividad y composición bioquímica modificando la concentración de nitrógeno, fósforo o la relación entre ellos, esto deriva en que el contenido y composición de ácidos grasos, vitaminas y aminoácidos libres de las microalgas también varía con las condiciones de nutrientes del medio (De Paw *et al.*, 1983 *ibid*) .

Las modificaciones cualitativas del medio de cultivo son fundamentales ya que las microalgas presentan por ejemplo, la capacidad de utilizar diferentes sustratos como fuente de nitrógeno (Kaplan *et al.*, 1995). No obstante, en función del estado de óxido-reducción del nitrógeno, éste será asimilado por diferentes rutas metabólicas. La fuente de nitrógeno es un factor que puede afectar al crecimiento y composición bioquímica de una microalga en cultivo ya que dependiendo de la

fuentes de nitrógeno asimilada, es posible obtener variaciones entre las fracciones proteica, glucídica y lipídica de la célula microalgal (Fogg y Collyer, 1953).

El costo de los componentes utilizados en los medios de cultivo es un factor significativo en el costo total de la producción microalgal (Chisty, 2007 op. cit.). Por esta razón, se han desarrollado métodos de enriquecimientos simplificados, menos costosos, particularmente para sistemas exteriores en los que se cultivan grandes volúmenes de microalgas. El método más sencillo es añadir fertilizantes con nitrógeno y fósforo al agua en razones apropiadas a la cepa en evaluación y considerando las condiciones locales (Richmond, 1980). La manipulación de la relación N:P es un buen método para ejercer control sobre las especies de microalgas en tanques exteriores.

Además de la composición de los medios de cultivo algunas de las características fisicoquímicas más importantes e influyentes en el proceso de obtención de biomasa microalgal se describen a continuación.

2.8.2 Concentración del ión hidrógeno. EL pH es uno de los factores más importantes en el cultivo microalgal. Las membranas plasmáticas de las células microalgales no son libremente permeables a los iones hidrógeno e hidroxilo, por lo tanto, las concentraciones de hidrogeniones extracelular e intracelular no están necesariamente equilibradas y existe un gradiente de concentración de hidrogeniones a través de la membrana (Pirt and Pirt, 1977). Las microalgas muestran una clara dependencia respecto al pH del medio de cultivo y diferentes especies varían ampliamente en su respuesta. Cada microalga presenta un pH óptimo para su cultivo (entre 7 y 9).

El pH del medio en el cual crecen las células afecta los procesos biológicos. Un efecto muy marcado del pH se observa en cuerpos de agua que soportan altas densidades poblacionales tales como lagunas eutrofizadas o piscinas para cultivos

de peces (Kaplan *et al.*, 1995 op. cit.). En esos hábitats extremos pueden darse importantes variaciones del pH durante el día. Estos rangos pueden ir desde 6,5 en la noche debido a acumulación del CO₂ eliminado por la respiración, hasta valores de pH de 11 en horas de la tarde, cuando el CO₂ y el HCO₃⁻ están disminuidos totalmente por el proceso de la fotosíntesis (Kaplan *et al.*, 1995 *ibid*).

El colapso completo del cultivo debido a la disrupción de muchos procesos celulares puede resultar de una falla en mantener el rango aceptable de pH y/o en la imposibilidad de mantener el cultivo suficientemente aireado (Raven, 1988).

En el caso de los cultivos microalgales de alta densidad, la adición de CO₂ permite corregir el incremento del pH, el cual puede llegar a niveles inhibitorios para el crecimiento (por encima de 10). (Azov, 1982). Se ha encontrado que ante el incremento en biomasa de *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella kessleri* como una función del pH, tal variación ocurrió en los cultivos de microalgas debido a la solubilización y consumo del CO₂, otros sustratos y la producción de metabolitos (Goldman *et al.*, 1981).

2.8.3 Temperatura. La temperatura medioambiental es un factor al que la biomasa algal responde continuamente. La temperatura de la célula es igual a la del medio de cultivo, en contraste con otros parámetros del medio, tales como el pH. La temperatura afecta la velocidad de las reacciones celulares, la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa, así como su producción y composición bioquímica. En las microalgas existe una relación entre la temperatura y la actividad biológica, aumentando la tasa de crecimiento cuando aumenta la temperatura dentro de un rango óptimo, por encima del cual el crecimiento disminuye bruscamente en algunas ocasiones hasta llegar a cero si la temperatura continúa incrementándose (Goldman, 1974).

La dependencia a la temperatura del crecimiento algal hace que se despliegue un incremento exponencial del rendimiento hasta que se alcanza la temperatura óptima (Kruger *et al.*, 1978). Esto es importante para las producciones a gran escala de microalgas ya que la tolerancia a la temperatura disminuye fuertemente con el aumento de la densidad óptica de la suspensión, esto es, con el detrimento en la disponibilidad de irradiación en las células del cultivo, fenómeno que se da particularmente en los cultivos en masa en sistemas de cultivo en exteriores (Grobbs *et al.*, 1990 op. cit.). El rango de requerimientos de las algas en cuanto a temperatura varía desde psicrófilas a mesófilas, lo que incluye especies algales promisorias para cultivos algales comerciales, hasta especies termófilas las que incluyen especies algales para las que la temperatura óptima de crecimiento es superior a 40°C (Kruger *et al.*, 1978 op. cit.).

La temperatura óptima para el cultivo del fitoplancton esta generalmente entre 20 y 24°C, aunque esto puede variar dependiendo de la composición del medio de cultivo, y las especies cultivadas. La mayoría de algas comúnmente cultivadas soportan temperaturas de 16-27°C, temperaturas menores de 16°C retrasan el crecimiento celular y mayores de 35°C son letales para la mayoría de las especies (Pirt and Pirt, 1977 op. cit.).

Se ha investigado la respuesta a la temperatura de diferentes especies verdes y verde azules de microalgas, la mayoría de las cepas mostraron una curva de respuesta óptima a la temperatura con una amplia meseta que terminaba en una fase de declinamiento rápida, lo que reflejaba un profundo efecto inhibitorio originado por la temperatura la cual excedía a la óptima por solamente 2 o 3 grados (Payer *et al.*, 1980). Las elevaciones de temperatura se pueden controlar con adición de agua fría refrigerante o aire fresco en el burbujeo.

Un aspecto singular del efecto de la temperatura relativamente alta está relacionado con la producción comercial de biomasa algal. Un estudio (Umoren y

Lind, 2005) evaluó la temperatura óptima para el crecimiento tanto a baja como a alta temperatura en cepas de *Chlorella* sobre el punto de saturación de luz. Se encontró que a 25°C la velocidad de crecimiento, respiración y fotosíntesis fueron ligeramente más altas para las cepas creciendo a altas temperaturas que para las que crecían a bajas temperaturas. Sin embargo, si se comparaban las temperaturas óptimas para el crecimiento, la cepa de baja temperatura había doblado su material celular mientras que la cepa de alta temperatura lo había doblado nueve veces durante periodos de 24 horas. La velocidad de fotosíntesis fue cuatro veces más alta a saturación de luz y de tres a seis veces más alta a media saturación de luz que en las algas que crecen a bajas temperaturas. La mayor productividad de las cepas que crecen a altas temperaturas está relacionada con la habilidad para utilizar la alta temperatura y los niveles de iluminación para crecimiento y fotosíntesis (Sorokin, 1969).

2.9 FACTORES NUTRICIONALES PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS

2.9.1 Carbono. Para obtener altas tasas de producción autotrófica, los suplementos más importantes son el CO_2 y HCO_3 . Contrario a las plantas terrestres, el CO_2 atmosférico no satisface los requerimientos de carbono para la alta productividad de los sistemas de producción algal (Lee and Passon, 1994).

El sistema carbonato-bicarbonato es el buffer más importante generalmente presente en cuerpos de agua dulce y es el mejor control para mantener los niveles de pH en los rangos óptimos para el crecimiento de especies de microalgas cultivadas (Richmond, 1980 op. cit.). Esta reacción implica que durante la fijación fotosintética del CO_2 , el OH acumulado en la solución de crecimiento va a provocar el aumento gradual del pH. Así pues no es extraño encontrar mediciones de pH de por encima de 11 en sistemas de producción de microalgas de alta densidad en los que no se hace adición de CO_2 (Richmond, 1980 op. cit.). El control de pH vía directa del CO_2 disuelto en el medio de cultivo es el mejor y más

conveniente método de control de pH y al mismo tiempo suplemento de CO₂ para la alta productividad en los sistemas de biomasa algal (Becker, 1994 op. cit.). En ciertas especies el carbono puede ser adicionado en forma orgánica como azúcares, ácidos y alcoholes para el crecimiento mixotrófico. Por ejemplo la adición de ácido acético como fuente de carbono podría además regular de manera importante el pH del medio de cultivo (Cid *et al.*, 1992).

2.9.2 Nitrógeno. Después del carbono, el nitrógeno es el nutriente más importante que contribuye a la producción de biomasa. El contenido de nitrógeno de la biomasa puede estar en un rango desde el 1-10% y esto no solo varía entre diferentes grupos sino entre especies particulares, dependiendo de la adición y la disponibilidad (Utting, 1995; Cohen, 1986; Vieira y Klaveness, 1986).

La limitación de nitrógeno en el medio de cultivo tiene como consecuencias, la decoloración de las células (disminución de la clorofila y aumento de los carotenoides) y acumulación de ciertos compuestos orgánicos como polisacáridos y ciertos aceites, entre otras (Becker, 1994 op. cit.).

El nitrógeno es un constituyente esencial de todas las proteínas estructurales y funcionales en las células algales y representa del 7-10% de la materia celular seca (Chisty, 2007 op. cit.). Las microalgas han limitado la habilidad de producir materiales de reserva de nitrógeno cuando crecen bajo condiciones de suficiencia, a excepción de la cianoficina (Simon, 1971) y ficocianina (Boussiba y Richmond, 1980), las cuales son formas de almacenamiento de nitrógeno presentes en muchas cianobacterias.

Numerosos estudios muestran que la biosíntesis y acumulación de lípidos está reforzada por la limitación de nitrógeno en cultivos de microalgas de varios grupos taxonómicos (Thompson, 1992). En contraste a los lípidos polares de células con suficiente nitrógeno, los lípidos neutros en forma de triacilglicerol se vuelven

componentes predominantes de las algas con limitación de nitrógeno (Thompson, 1992 *ibid*). La acumulación de lípidos neutros bajo condiciones de limitación de nitrógeno es específica de especie y tiene implicaciones fisiológicas que aun no han sido totalmente descritas (Becker, 1994 *op. cit.*).

2.9.3 Fósforo. El fosforo es el tercero de los principales macronutrientes y juega un rol importante en los procesos metabólicos para la formación de componentes estructurales y funcionales requeridos para el desarrollo normal y crecimiento de las microalgas (Goldman, 1982 *op. cit.*). El fósforo es esencial para el crecimiento y muchos procesos celulares tales como transferencia de energía, síntesis de ácidos nucleicos, DNA etc. Su deficiencia provoca un descenso en la síntesis de ácidos nucleicos, ATP y clorofila (Boney, 1989). Aunque la biomasa algal contiene menos del 1% del fósforo, es uno de los factores limitantes más importantes en la biotecnología algal (Abalde *et al.*, 1995 *op. cit.*). Cuando los nutrientes son suministrados en exceso y la luz es el factor limitante, la mayoría de especies de algas muestran un contenido de fosforo celular de 1% en peso seco (Goldman J, 1982 *op. cit.*).

La forma en la cual es adicionado a las algas es como fosfato inorgánico y su captación es dependiente de la energía. El fosfato inorgánico es incorporado en componentes orgánicos a través de varios tipos de fosforilación. En resumen, los fosfatos inorgánicos pueden también llegar a la célula y acumularse en forma de gránulos de polifosfato (Healey, 1982). Estos gránulos de polifosfato a menudo aparecen en células normales bajo crecimiento con suficiente fósforo, pero desaparecen una vez el fosfato es deficiente en el cultivo. Algunos de estos síntomas de depleción de fósforo son similares a los observados en los cultivos limitados por nitrógeno; el contenido de clorofila a tiende a disminuir mientras el contenido de carbohidratos aumenta en eucariotas y procariotas (Healey, 1982 *ibid*).

Debido a que el fósforo está frecuentemente unido a otros iones (carbonato y hierro) se precipita y se encuentra en forma poco captable por los microorganismos por lo que su suministro no siempre es suficiente. El fósforo suplementado influencia la composición de la biomasa producida, especialmente el contenido de lípidos y carbohidratos. Es importante también la relación N:P en el medio de cultivo ya que esto no solo determina el potencial de la productividad si no también es importante para mantener la dominancia de especies candidatas en el medio de cultivo (Borowitzka, 1999).

2.10 PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS MICROALGALES Y TRANSFORMACIÓN A BIOCOMBUSTIBLES.

La habilidad de las microalgas para sobrevivir o proliferar en un amplio rango de condiciones medioambientales refleja su diversidad y está relacionada también con la variedad de patrones lipídicos que presentan (Chisty, 2007 op. cit.). Estos pueden incluir, aun cuando no están limitados a ellos, lípidos neutros, lípidos polares, ceras, esteroides e hidrocarburos, así como derivados fenólicos como tocoferoles, carotenoides, terpenos, quinonas y derivados pirrólicos como las clorofilas (Lee and Loeblich, 1971). Las microalgas además tienen la habilidad de modificar eficientemente el metabolismo de los lípidos que almacenan en respuesta a los cambios en el medio ambiente (Gushina y Harwood 2006).

Bajo condiciones óptimas de crecimiento las algas sintetizan ácidos grasos principalmente por esterificación en lípidos de membrana con base en el glicerol, los cuales constituyen entre el 5 y el 20% del peso seco de la célula (Paoletti, 1976). Los ácidos grasos incluyen especies de cadena media (C10-C14), cadena larga (C16-C18) y cadena muy larga (>C20).

En condiciones medioambientales desfavorables o estrés para su crecimiento, muchas microalgas alteran sus vías biosintéticas de lípidos hacia la formación y acumulación de lípidos neutros (20-50% en peso seco), principalmente en forma

de triglicéridos (TAG) (Fried *et al.*, 1982, Shefer *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 1989) . A diferencia de los glicerolípidos encontrados en la membrana, los TAG no tienen un rol estructural sino que sirven como forma de almacenamiento primario de carbón y energía (Volkman *et al.*, 1989). Sin embargo, existe evidencia que sugiere que la biosíntesis de TAG juega un papel activo en la respuesta a condiciones de estrés medioambiental (Pioneck *et al.*, 1981).

Luego de ser sintetizados, los TAG son depositados en cuerpos lipídicos densamente empacados localizados en el citoplasma de la célula algal, aunque la formación y acumulación de cuerpos lipídicos ocurre también en los espacios intertilacoideos del cloroplasto en ciertas algas verdes, como *Dunaliella bardawi* (Ben-Amortz *et al.*, 1989).

Los hidrocarburos son otra clase de lípidos neutros que se pueden encontrar en algas en cantidades menores al 5% en peso seco (Lee y Loeblich, 1971 op. cit.). Únicamente el alga verde, *Botryococcus braunii* ha mostrado la capacidad para producir bajo condiciones medioambientales adversas grandes cantidades (hasta el 80% en peso seco) de hidrocarburos de cadena muy larga (C23-C40), similares a los encontrados en el petróleo y por lo tanto esta cepa ha sido estudiada durante décadas como una posible fuente para el suministro de formas renovables de energía como los biocombustibles (Banerjee *et al* 2002; Metzger y Largeau, 2005).

Varias especies microalgales crecen rápidamente y producen cantidades importantes de TAG o hidrocarburos por lo que se les ha denominado algas oleaginosas y en razón a ello se ha postulado que las algas podrían llegar a ser empleadas como fábricas celulares para producir combustibles (Beneman *et al.*, 1982 op. cit.; Sheehan *et al.*, 1998 op. cit., Borowitzka, 1999 op. cit.). Las ventajas potenciales de las algas como materia prima para biocombustibles y biomateriales incluyen su habilidad para:

1. Sintetizar y acumular grandes cantidades de lípidos neutrales (20-50% peso seco)
2. Crecer a alta velocidad (por ejemplo pueden tener hasta 1 a 3 duplicaciones por día)
3. Desarrollarse en aguas salinas/salobres, aguas marinas que no tienen muchos usos.
4. Tolerar tierras marginales (por ejemplo, desiertos, tierras áridas y semi áridas) no utilizables para agricultura convencional.
5. Utilizar para su crecimiento nutrientes como nitrógeno y fósforo provenientes de una variedad de aguas residuales, lo que provee el beneficio adicional de la posibilidad de biotratar las aguas residuales.
6. Secuestrar dióxido de carbono de gases emitidos de plantas de combustión y otras fuentes, reduciendo por lo tanto, las emisiones y gases de invernadero.
7. Generar productos y subproductos de valor agregado (biopolímeros, proteínas, polisacáridos, pigmentos, alimentos para animales, fertilizantes e hidrógeno entre otros)
8. Crecer en recipientes apropiados (fotobiorreactores) a lo largo del año con productividades anuales por área que exceden diez veces las obtenidas por cultivos terrestres (maíz, soya, sorgo).

En la literatura se referencian diversas cepas y su potencial. A continuación se presentan dos cuadros que resumen las cepas de microalgas potenciales para la producción de lípidos con base en su capacidad para acumularlos:

Tabla1. Contenido de lípidos de algunas microalgas

Especies	% Lípidos (materia seca)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11-22/35-55
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	6-7/16-40
<i>Chlorella vulgaris</i>	14-40/56
<i>Chlorella emersonii</i>	63
<i>Chlorella protothecoides</i>	23/55
<i>Chlorella sorokiana</i>	22
<i>Chlorella minutissima</i>	57
<i>Dunaliella bioculata</i>	8
<i>Dunaliella salina</i>	14-20
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-65
<i>Spirulina Maxima</i>	4-9

Fuente: (Gouveia and Oliveira, 2009)

Tabla 2. Composición bioquímica de las algas, expresada en una base de materia seca

Alga	Proteína (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)	Ácidos Nucleicos (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1,9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-

Fuente: (Becker, et al.1994).

Como se puede observar en la Tabla 2, los porcentajes varían en función del tipo de algas, en algunos géneros los lípidos pueden llegar hasta el 40% de su masa total.

Con base en los fluctuantes precios de los combustibles, la disminución de las reservas de crudo y el deterioro medioambiental asociado al consumo de combustibles fósiles se ha renovado el interés por utilizar las microalgas como una materia prima para producción de lípidos y su conversión a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME's), los cuales son utilizados como sustitutos de los derivados fósiles del petróleo para la producción de biocombustibles y otros productos energéticos (Sheehan *et al.*, 1998 op. cit.).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Microorganismo. Para la estandarización de los métodos analíticos se utilizó una cepa de *Chlorella vulgaris* cedida por la Universidad Autónoma Metropolitana de México (UAM). Posteriormente se realizaron los estudios de optimización de las condiciones de cultivo y producción de lípidos con la cepa de *Chlorella* sp Ch4 seleccionada como la mejor en un estudio de crecimiento y producción de lípidos realizado con base en siete (7) cepas aisladas de las campañas de muestreo a ambientes lénticos dulceacuícolas de la cuenca baja y media del Río Magdalena.

3.1.2 Medios de Cultivo

3.1.2.1 Medio para aislamiento de microalgas. Los medios de cultivo empleados para el aislamiento y cultivo de las microalgas fueron el Caldo Bristol (Starr and Zeikus, 1993) (ver Anexo 3) y Agar Bristol (Agar-agar al 1,5%), que contenía telurito de potasio al 0,1%; los reactivos empleados fueron de grado analítico. Se utilizaron los medios de cultivo comerciales Agar Papa Dextrosa, Agar Malta y Agar Nutritivo (Merck). Los medios fueron esterilizados por autoclavado a 121°C durante 15 minutos (Autoclave Brinkmann Tuttnauer 3870).

3.1.2.2 Medios para el mantenimiento y conservación de las microalgas. Se utilizó Medio Bristol (Starr and Zeikus, 1993) (ver Anexo 3), líquido y suplementado con Agar-Agar al 1,5% y glicerol (Merck). Los medios fueron esterilizados por autoclavado a 121°C, 15 minutos (Autoclave Brinkman n Tuttnauer 3870).

3.1.2.3 Medios utilizados para los estudios de cinética de crecimiento y producción de lípidos. Para los estudios en reactores de 1, 2 y 12 litros se utilizó Medio Bristol (Starr and Zeikus, 1993) (ver Anexo 3) preparado con agua corriente, sin esterilización para mantener condiciones experimentales reales para el escalado del proceso.

Para los estudios en reactores de 20 y 220 litros se utilizó medio Bristol con agua residual de PTAR de la Gerencia Centro Barrancabermeja al 10%.

Reactores

Para el mantenimiento de las microalgas se utilizaron erlenmeyers de 250 mL. Para los estudios de las cinéticas de crecimiento se utilizaron erlenmeyers de 1 y 2 litros. Para los estudios cinéticos de crecimiento y producción de lípidos se utilizaron columnas acrílicas de burbujeo de 12 litros de capacidad y finalmente para el estudio a escala piloto se utilizó una columna acrílica de 20 litros y un reactor acrílico en columna con fondo cónico de 220 litros.

3.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA

3.2.1 Recuento Celular en cámara de Neubauer (Schoen, 1988)

- **Procedimiento para recuento de microalgas**
 - a. Obtener un mililitro de muestra, previa homogenización del cultivo por agitación.
 - b. Realizar el llenado de la cámara con una micropipeta calibrada.
 - c. Realizar el recuento de acuerdo con los siguientes criterios:

- Para muestras con baja concentración celular (menos de 20 células por cuadro pequeño) se debe realizar el recuento en los cuatro cuadros de los extremos de la cámara (cada uno con 16 cuadros pequeños).
- Para muestras con alta concentración celular (más de 20 células por cuadro pequeño) se deben contar las células presentes en cinco cuadros menores del cuadro central de la cámara (que tiene 25 cuadros pequeños).

d. Determinar el número de células con base en los siguientes cálculos:

- Si se contaron todas las células presentes en los cuatro cuadros de 1mm^2 (16 cuadros), la concentración celular se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C=N.10^4.D$$

En donde:

C= células/mL

N= Promedio de células presentes en los cuatro cuadros (1mm^2)

D= Factor de dilución. (Cuando se consideró necesario).

10^4 = Factor de conversión de $0,1\ \mu\text{L}$ a $1\ \text{mL}$

- Si se contaron todas las células presentes en el cuadro central (25 cuadros) considerando solamente 5 cuadros menores del cuadro central , la concentración celular se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C= [(N/(4 \times 10^{-6}))].D$$

La precisión del recuento depende de la distribución al azar de las células sedimentadas. En el caso de especies que forman cadenas, se deben contar las cadenas y posteriormente determinar el promedio de células por cadena, con el cual se puede calcular el número total de células de esa especie presente en la cámara.

3.2.2 Determinación de la concentración celular por Densidad Óptica (Arredondo y Voltolina, 2007).

- **Procedimiento**

- a. Obtener dos mililitros de muestra, previa homogenización del cultivo por agitación.
- b. Lavar dos veces la biomasa por centrifugación a 4400 rpm por 10 min a 4°C.
- c. Dejar en reposo media hora para que se alcance la temperatura ambiente antes de realizar la lectura. Mezclar y llenar la celda con la solución del medio.
- d. Realizar la lectura y si es necesario diluirla. El factor de dilución debe tenerse en cuenta para los cálculos finales de absorbancia.
- e. Leer la absorbancia a la longitud de onda de 675 nm.

3.2.3 Determinación de Biomasa de microalgas por curva patrón de peso seco (Sorokin, 1973). El peso seco de la biomasa microalgal presente en un cultivo se calculó utilizando una curva patrón de biomasa seca relacionada con la densidad óptica a 675 nm medida en un espectrofotómetro Cary Varian 5000,

Esta determinación se puede ver afectada por la cantidad de sales presentes en el medio, en los espacios intercelulares y en la superficie celular, por lo que es indispensable eliminarlas mediante un procedimiento de lavado previo (Zhu y Lee, 1997).

- **Procedimiento para la construcción de la curva de calibración para determinación de la concentración de *Chlorella* sp., mediante el método de peso seco**

- a. Eliminar la humedad de los filtros (acetato de celulosa, Whatman de 0,45 μm) por calor seco a 80°C *overnight*, colocarlos en un desecador y pesar los filtros de membrana de 0,45 μm hasta valor constante.
- b. Preparar 800 mL de inóculo de *Chlorella* sp en una columna de vidrio de 2 L utilizando medio Bristol a 25 ± 2 °C, humedad relativa $63 \pm 3\%$, aireación constante de 1 vvm e iluminación permanente (Ver 3.3.1.3).
- c. Recuperar la biomasa por centrifugación a 4400 rpm, 4°C, 10 min.
- d. Lavar la biomasa con agua estéril dos veces para eliminar impurezas.
- e. Resuspender la biomasa en el volumen original de agua destilada.
- f. Preparar al menos cinco diluciones seriadas a partir de esta resuspensión.
- g. Leer la absorbancia de cada dilución a 675 nm en un espectrofotómetro previamente calibrado.
- h. Filtrar al vacío tres alícuotas de 20 mL de cada dilución utilizando filtros (acetato de celulosa, Whatman de 0,45 μm), secar a 80°C *overnight*, colocar en un desecador y pesar hasta valor constante.
- i. Graficar la concentración de biomasa contra la absorbancia obtenida y hallar por regresión lineal la relación entre peso seco y absorbancia a 675 nm (ver Anexo 1).

3.2.4 Determinación del contenido de lípidos (Bligh y Dyer, 1959)

3.2.4.1 Procedimiento de Extracción de lípidos totales (Método de Bligh y Dyer (1959) adaptado para la extracción de lípidos de microalgas.

- a. Pesar 50 mg de microalgas liofilizadas en un tubo de vidrio de 15 mL (tubo 1). Si es muestra fresca debe determinarse la proporción de humedad para referir los resultados a peso seco.
- b. Adicionar 3 mL de una mezcla de solventes cloroformo: Metanol (1:2) sin agua

- c. Agregar una cantidad de antioxidante BHT (Butil hidroxitolueno [E-321] es un antioxidante sintético procedente de la industria petrolera), menor al 1% de los lípidos totales.
- d. Sonicar a máxima potencia por 15 min (3 ciclos) en un baño de agua con hielo.
- e. Incubar los tubos 24 h a 4°C protegidos de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
- f. Sonicar otros 15 min (3 ciclos) en frío antes de centrifugar.
- g. Centrifugar a 7000 rpm por 15 min a 4°C. Recuperar el extracto con una pipeta Pasteur y pasarlo a un tubo de vidrio de 15 mL (tubo 2). Agregar 1,5 mL de CHCl_3 : CH_3OH (1:2) a la biomasa residual y centrifugar nuevamente a 7000 rpm por 15 min a 4°C, recuperando el extracto (tubo 2).
- h. Agregar 2 mL de agua destilada al tubo 2, que contiene el extracto y agitar con vórtex. Eliminar el exceso de agua de la capa superior y centrifugar a 7000 rpm por 15 min a 4°C y separar la fase inferior formada de cloroformo y lípidos.
- i. Agregar 1 mL de cloroformo y separar la fase inferior (CHCl_3 : lípido), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur y burbujeando aire hasta el fondo del tubo. Colocar la fase CHCl_3 : lípido (tubo 3) con nitrógeno gaseoso.
- j. Proceder a la cuantificación de lípidos totales.

3.2.4.2 Procedimiento para la Cuantificación de lípidos: Método de calcinación de para la determinación de lípidos totales Marsh y Weinstein (1966)

- a. Resuspender los lípidos totales, considerando una cantidad inferior al máximo valor de la curva de lo contrario realizar dilución en 1 mL de cloroformo y pasar una alícuota de 100 μL a otro tubo.
- b. Evaporar hasta sequedad con nitrógeno gaseoso.
- c. Agregar 2 mL de H_2SO_4 concentrado, sellar el tubo con papel aluminio con el fin de evitar contaminación y cerrar con la tapa.

- d. Calentar a $200 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en estufa por 15 min.
- e. Dejar reposar 5 min a temperatura ambiente.
- f. Colocar los tubos en un baño de agua con hielo durante 5 min.
- g. Agregar 3 mL de agua destilada.
- h. Mezclar en el vórtex y verificar que la mezcla quede homogénea y sin residuos de materia orgánica.
- i. Leer la absorbancia en el espectrofotómetro Cary Varian a 375 nm previa calibración del equipo con un blanco de ácido sulfúrico que se trata de igual manera que la muestras e interpolar el valor en la curva de calibración.

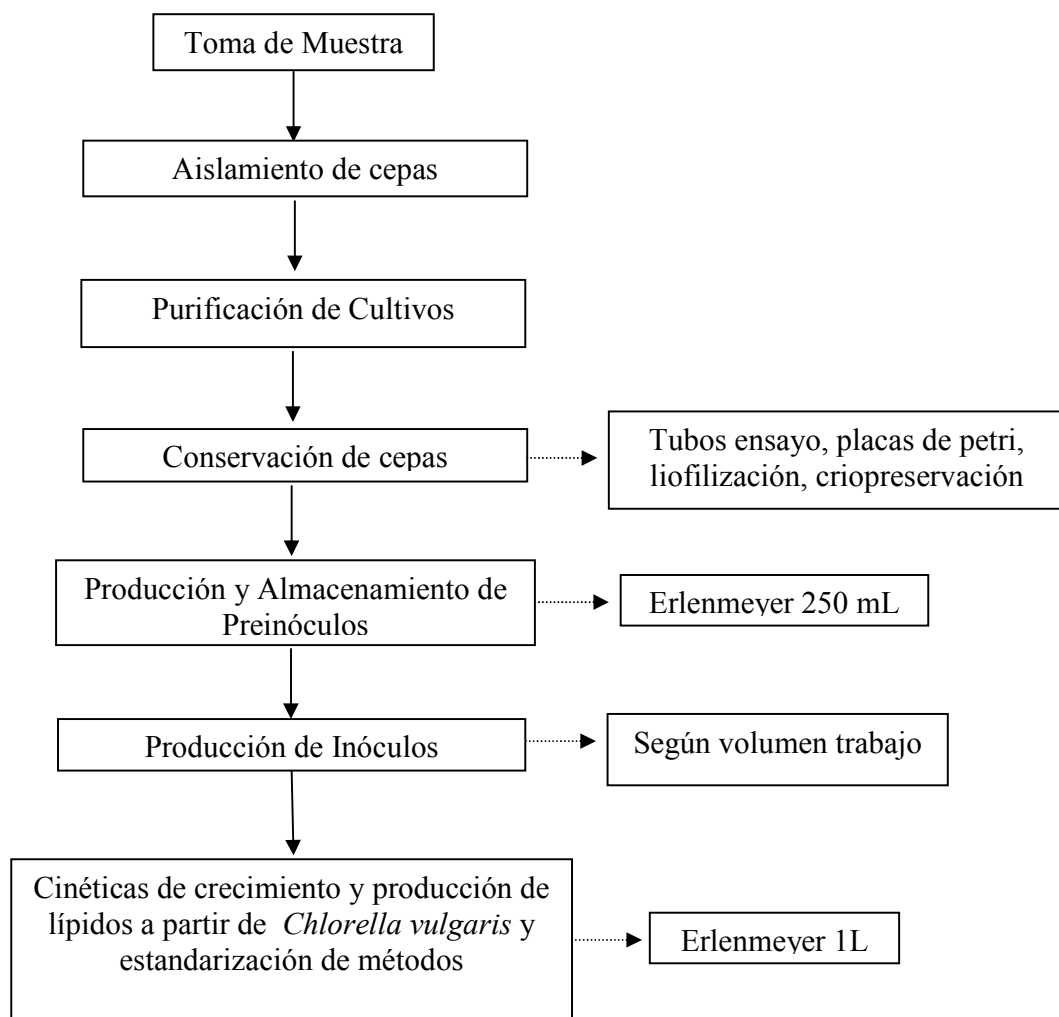
3.2.4.3 Procedimiento para elaboración de la curva de calibración para determinación de Lípidos Totales en cepas de microalgas. Para elaborar la curva de calibración de lípidos utilizando la técnica de Marsh y Weinstein (1966), se utilizó el aceite refinado proveniente de aceite de palma como patrón de comparación. El procedimiento fue el siguiente:

- a. Se preparó una solución madre de 10,000 ppm de aceite en cloroformo/metanol 2:1 a partir de la cual se preparó una solución de trabajo de 1000 ppm en cloroformo/metanol 2:1.
- b. Se prepararon diluciones a 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280 y 320 ppm, a partir de la solución de trabajo, diluyendo en cada caso con la mezcla de solventes antes mencionada.
- c. De cada una de las soluciones preparadas se tomó 1 mL, se secó en atmósfera de nitrógeno y se adicionaron 2 mL de H_2SO_4 concentrado. Posteriormente, las muestras se llevaron a un horno durante 15 minutos a 200°C .
- d. Los tubos se dejaron enfriar y se colocaron durante 5 minutos en hielo, se adicionó a cada uno 3 mL de agua, se dejaron en reposo 10 minutos y se leyó la absorbancia a 375 nm utilizando un blanco de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ 1:2, el

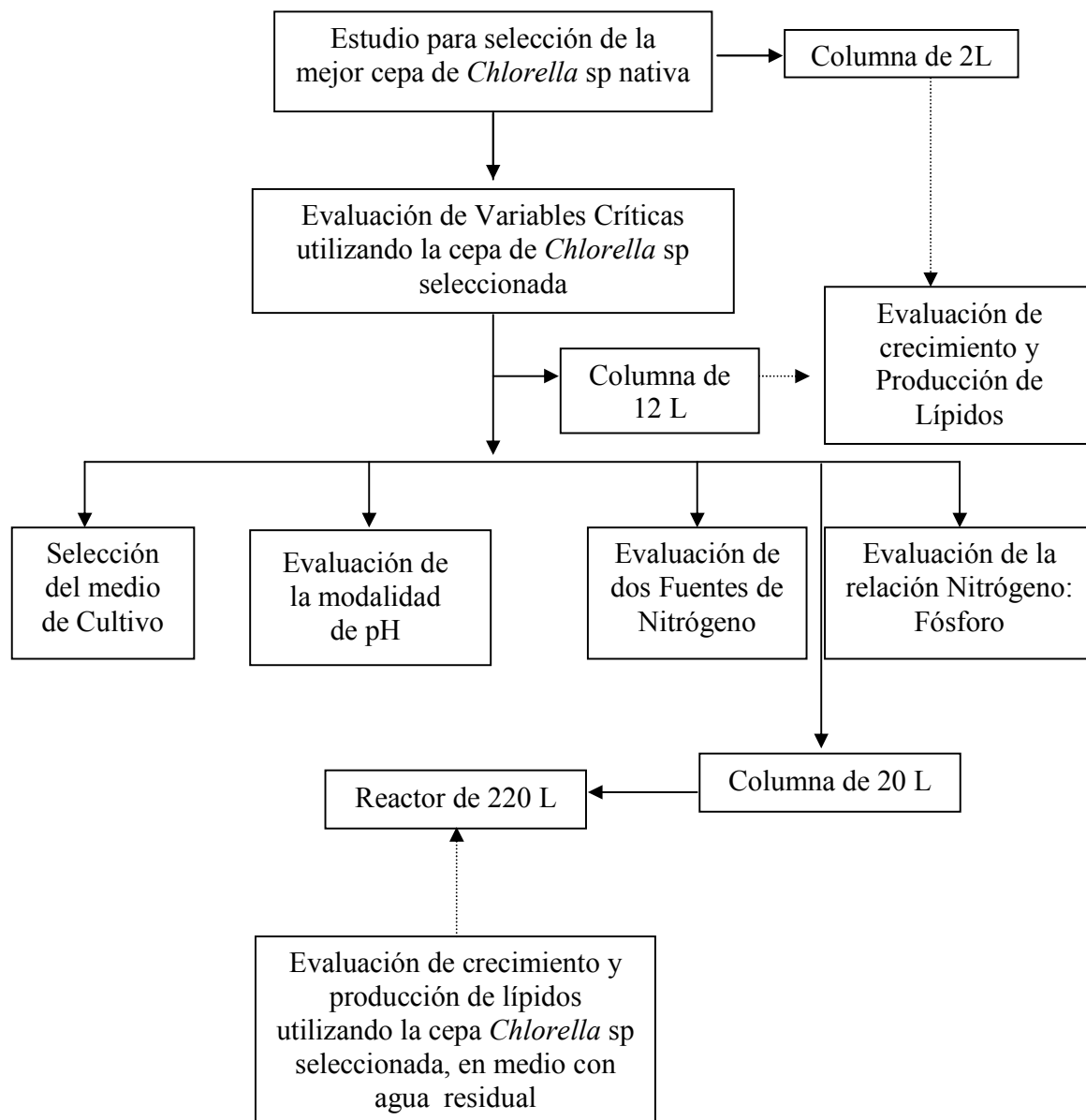
cual se trató como las muestras. Se realizaron lecturas por duplicado y se contruyó la curva de calibración correspondiente (ver Anexo 2)

3.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

AISLAMIENTO DE CEPAS, CONSERVACIÓN Y MANEJO DE INÓCULOS



SELECCIÓN DE CEPA Y EVALUACION DE MEJORES CONDICIONES DE CULTIVO



3.3.1 Metodologías para el Aislamiento, mantenimiento, conservación y manejo de inóculos de cepas de *Chlorella* sp

3.3.1.1 Toma de muestra y aislamiento de cultivos unialgales de microalgas del género *Chlorella* sp. El aislamiento de las microalgas se realizó a partir de muestras de agua obtenidas en sistemas lénticos de la cuenca del Magdalena; desde piscinas de oxidación hasta ciénagas en áreas de influencia de los campos de producción de ECOPETROL S.A.

El procedimiento que se siguió fue el siguiente (Anexo 4):

a. Obtención de la muestra y preenriquecimiento inicial. Una muestra de 4 litros obtenida del cuerpo de agua se concentró a través de una malla de plancton de 20 μm a un volumen de 360 mL el cual se llevó a una botella de 500 mL de capacidad. A la muestra se le adicionó medio de cultivo Bristol (Starr & Seikus, 1983) (Anexo 3), para llevar a un volumen final de 400 mL como condición de preenriquecimiento y para la conservación de la biomasa presente. El medio Bristol constituye un medio por composición adecuado para el crecimiento y mantenimiento de microalgas autótrofas (Andersen, 2005). Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Biotecnología en condiciones de refrigeración.

b. Caracterización de la muestra y aislamiento de microorganismos. Cada muestra se observaba utilizando un microscopio Olympus BX51. Los organismos observados fueron identificados por los profesionales del área de Bioensayos del Laboratorio de Biotecnología utilizando claves de identificación de algas contenidas en la sección 110900D de la edición 21 del Standard Methods de la AWWA. Si eran evidentes las microalgas, la muestra se inoculaba al 10% V/V en un erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 80 mL de medio líquido Bristol y Telurito de potasio al 0,1% y se incubaba durante 8 días a 18-22°C, aireación permanente y luz constante de 500 a 1000 lux. El telurito de potasio se empleaba como agente bacteriostático para controlar y paulatinamente inhibir otros

microorganismos y se aplicaba en la concentración reportada en literatura (Ducker y Willoughby, 1964; Rosowski y Hoshaw, 1970). A partir del medio líquido y dependiendo de la concentración microalgal, se realizaban diluciones seriadas 1:10 de los cultivos con agua destilada para bajar la carga microalgal y bacteriana. Muestras de las diluciones se contaban en cámara de Neubauer y se realizaba aspiración con micropipeta de células aisladas las que se sembraban en cajas de Petri con medio Bristol solidificado con agar al 1,5% y telurito de Potasio al 0,1% y se incubaban durante 8 días a en iguales condiciones a las descritas hasta evidenciar colonias, este procedimiento se repitió hasta obtener cultivos unialgales y sin bacterias.

c. Obtención de cultivos puros. Durante el proceso de aislamiento de microalgas se descartaba la presencia de otros microorganismos en el cultivo, sembrando la muestra en agar nutritivo para bacterias y agar malta para hongos. Los cultivos puros se inoculaban en medio Bristol líquido y sólido sin telurito de potasio, para mantenimiento y conservación.

d. Ingreso al cepario: Bajo el microscopio se verificó la pureza del cultivo, se codificó e ingresó a la colección de cepas (cepario) de microalgas del Laboratorio de Biotecnología de ECOPETROL ICP. En el cepario todas las microalgas se conservaron en medio Bristol sólido con glicerol al 10% (Procedimiento 3.3.1.2) con repique cada tres meses.

3.3.1.2 Mantenimiento en subcultivo de las cepas aisladas. Con el propósito de mantener las cepas viables, fueron conservadas en condiciones de subcultivo a 4°C en medio Bristol sólido con y sin glicerol al 10% y en medio Bristol líquido.

Cada cepa de *Chlorella* sp aislada fue sembrada en superficie utilizando tubos de agar inclinado (20 tubos por cepa). Los cultivos fueron incubados a temperatura de

18-22°C y luz constante de 500 a 1000 lux. El cultivo fue revisado macro y microscópicamente para comprobar el estado de las algas.

Una vez se hacían evidentes las colonias, se revisaban bajo microscopio para verificar que los cultivos fueran unialgales y establecer la integridad de las células. A la mitad de los tubos se les adicionaba glicerol al 10% estéril (conservación de largo plazo) y a la otra mitad no (mantenimiento de inóculos madre para experimentación). Todos los tubos fueron almacenados en refrigeración a 4°C hasta por un periodo de tres meses y con ellos se realizaban las pruebas de conservación y otros ensayos. Cada semana durante este lapso de tiempo los cultivos se retiraban de la nevera, se exponían a luz durante 3 horas y nuevamente se almacenaban a 4°C, para mantener activos los cloroplastos.

Para la producción de una serie de preinóculos por cada cepa de *Chlorella* sp, se realizaba la siembra a partir de una o dos colonias de los tubos de ensayo almacenados sin glicerol en 10 tubos de ensayo de 20 mL de capacidad conteniendo 10 mililitros de medio Bristol líquido. Los tubos se colocaban en un rotor de tubos (Lab line 1640) a 120 rpm, 18-22°C, humedad relativa de 63±3% y luz constante entre 500 a 1000 lux, durante 4 días para luego inocular al 10%V/V con el contenido de cada tubo un erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio Bristol. Estos cultivos se incubaron durante 4 días a las mismas condiciones descritas hasta llegaban a fase exponencial.

El crecimiento de la cepa fue medido por recuento celular en cámara de Neubauer (Schoen, 1988) y densidad óptica a 675 nm (Arredondo y Voltolina, 2007). Los erlenmeyer se almacenaban en refrigeración a 4°C durante máximo dos meses; una o dos veces a la semana se agitaban manualmente en forma suave para variar la posición de las células y se exponían a luz durante 3 horas para mantener activos los cloroplastos y nuevamente se almacenaban a 4°C. Estos cultivos se utilizaron para la producción de inóculos.

3.3.1.3 Producción de inóculos. Para la producción de inóculos se retiraba de refrigeración un erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de cultivo (Ver 3.3.1.2), el cual se incubaba durante 24 horas a 18-22°C, humedad relativa 63±3%, aireación constante de 1 vvm y luz constante de 500 a 1000 lux. Con éste cultivo se inoculaba al 10% un erlenmeyer de un litro con 500 mL de medio de cultivo el que se incubaba a 25±2 °C, humedad relativa de 63±3%, a ireación permanente de 1 vvm y luz constante entre 2000 y 2500 lux hasta que la cepa se encontraba en fase exponencial. Para el escalado del cultivo, los reactores se inoculaban con el 10% de preinóculo.

3.3.2 Cinéticas de crecimiento y producción de lípidos a partir de *Chlorella* sp.

3.3.2.1 Cinética de Crecimiento para la cepa patrón de *Chlorella vulgaris*. Para conocer el comportamiento cinético mediante la elaboración de la curva de crecimiento en medio Bristol (Starr & Seikus, 1983) (Anexo 3) se utilizó como cepa patrón una cepa de *Chlorella vulgaris* cedida por la Universidad Autónoma Metropolitana de México.

A partir de un preinóculo almacenado a 4°C y siguiendo el procedimiento descrito en 3.3.1.3, se inocularon al 10%V/V erlenmeyers de 2 L de capacidad con volumen de trabajo de 1,25 L, los cuales fueron incubados a 25±2 °C, humedad relativa 63±3%, aire suministrado por burbujeo con bomba de acuario y luz constante entre 2000 y 2500 lux. Se tomaron muestras de 5 mL cada 24 horas durante 11 días para determinación de la densidad óptica a 675 nm (Arredondo y Voltolina, 2007), determinación de pH y recuento en cámara de Neubauer (Schoen, 1988).

3.3.2.2 Estudio de selección de la mejor cepa nativa de *Chlorella* sp. Para seleccionar la cepa de *Chlorella* sp con la que se realizarían las evaluaciones de variables críticas del proceso (pH, fuente de nitrógeno y relación Nitrógeno: Fósforo), se realizó un estudio de selección en el que se incluyeron las siete (7) cepas de *Chlorella* aisladas de las campañas de muestreo.

Se prepararon inóculos siguiendo el procedimiento descrito en 3.3.1.3, los que se inocularon al 10% V/V en reactores de 2L de capacidad con volumen de trabajo de 1,25L, temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa $63 \pm 3\%$, aireación constante de 1 vvm, luz constante entre 2000 y 2500 lux.y muestreo cada 24h durante 11 días para determinación de pH, crecimiento microalgal mediante peso seco (Sorokin, 1973) y cuantificación de lípidos (Bligh y Dyer,1959) (Marsh y Weinstein,1966) para elaboración de curvas y análisis de resultados.

Todas las cinéticas de crecimiento y producción fueron evaluadas con base en los siguientes parámetros cinéticos (ver Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros Cinéticos considerados para la evaluación de las cinéticas de crecimiento y producción con cepas de *Chlorella* sp.

PARAMETRO CINÉTICO	ECUACIÓN	UNIDADES
μ_{max}	$\ln X - \ln X_0 / t - t_0$	día^{-1}
Tg	$\ln 2 / \mu_{max}$	día
Q_X	$\Delta X / \Delta t$	gcél*/L.día
Q_P	$\Delta P / \Delta t$	gLip/L.día
$Y_{P/X}$	$\Delta P / \Delta X$	gLip/gcél
q_p	$\Delta P / \Delta X.t$	gLíp/gcél.día

Donde:

$\mu_{\max}$:	Velocidad específica de crecimiento (días^{-1})
t_g :	Tiempo de generación (días)
Q_X :	Productividad volumétrica (gcél/L.día)
Q_P :	Productividad volumétrica (gLip/L.día)
$Y_{P/X}$:	Rendimiento de Biomasa en Producto (gLip/gcél)
q_p :	Productividad específica (gLíp/gcél.día)
P :	Producto formado, referido a actividad volumétrica (gLíp/L)
t :	Tiempo de toma de la muestra (días)
X :	Concentración de biomasa (g/L)

3.3.3 Evaluación de variables críticas de proceso con la cepa *Chlorella* sp Ch4.

Para todas las evaluaciones se preparaban inóculos de *Chlorella* sp Ch4 como se describe en 3.3.1.3 los que se escalaban hasta que se inoculaban al 10%V/V en 8 reactores de acrílico (columnas aireadas) de 12L de capacidad con volumen de trabajo de 8L, temperatura de 25 ± 2 °C, humedad relativa de $63 \pm 3\%$, aireación permanente de 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux y muestreo cada 24h durante 9 días para determinación de biomasa seca neta (Sorokin, 1973) y cuantificación de lípidos (Bligh y Dyer, 1959) (Marsh y Weinstein, 1966) para elaboración de curvas y análisis de resultados.

3.3.3.1 Selección del medio de cultivo para el crecimiento y producción de lípidos utilizando la cepa *Chlorella* sp Ch4. Para establecer el medio de cultivo en el que se obtenía un mejor comportamiento cinético de la cepa *Chlorella* sp Ch4, se evaluó el efecto de cuatro medios de cultivo de composición diferente, teniendo en cuenta los parámetros de selección definidos en 3.3.2.2.

Los medios evaluados fueron el medio Bristol sin modificaciones, que corresponde a la fórmula del Bristol completo como lo reportan sus autores (Starr & Zeikus, 1993), el medio BG-11 modificado (Rippka *et al.*, 1979) sin ácido cítrico y nitrato reducido al 10%, el medio AL, que es una modificación del medio Algal (Fabregás *et al.*, 1985) sin vitaminas y el medio Bristol 2X, que es una formulación con las sales concentradas al doble del Bristol sin modificaciones (Ver anexo 3). Cada condición se evaluó por duplicado.

Para ésta evaluación, el aporte nutricional de los medios Bristol sin modificaciones, Bristol 2X, BG-11 y AL en nitrógeno como nitrato de sodio era de 41,2, 82,35, 123,5 y 280 ppm y en fósforo como fosfatos era de 53,25, 106,5, 3,56 y 40,3 ppm, respectivamente.

3.3.3.2 Evaluación de la modalidad del pH utilizando la cepa *Chlorella* sp Ch4. Teniendo en cuenta que el pH es una variable que ejerce un efecto sobre la fotoasimilación del carbono en cultivos microalgales y que los límites de tolerancia de las cepas están mediados tanto por la influencia química del mismo sobre el crecimiento como por su efecto metabólico sobre la fotosíntesis, se evaluaron tres condiciones iniciales de pH: 6,5, 7,5 y 8,5; se tuvo como cinética control una fermentación a pH en 8,0 el cual se ajustaba cada 12 horas con ácido sulfúrico 10N. Cada condición se evaluó por duplicado.

3.3.3.3 Evaluación del efecto de la urea y el nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella* sp Ch4.

Se evaluó el consumo de nitrato de sodio y urea comercial como fuentes de nitrógeno, con el fin de establecer su influencia en el crecimiento de la cepa nativa *Chlorella* sp Ch4. Las fuentes de nitrógeno se formulaban en el medio de cultivo de acuerdo con la concentración de nitrógeno presente en el medio Bristol que originalmente contiene nitrato de sodio. Se determinó el contenido de nitrógeno y se ajustó esa cantidad equivalente al nitrógeno presente en la urea empleando el

factor químico de conversión. Se utilizaron 0,25 y 0,098 g/L de nitrato y urea respectivamente. Estas relaciones, en términos estequiométricos, conservan la misma cantidad de nitrógeno. Cada condición se evaluó por duplicado.

3.3.3.4 Evaluación de la relación Nitrógeno: Fósforo y su influencia en el crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella* sp Ch4. Se evaluaron cuatro relaciones N:P (10:1, 30:1, 50:1 y 80:1) utilizando nitrato de sodio y fosfato diácido de potasio, para seleccionar la que promoviera un mayor crecimiento y producción de lípidos en *Chlorella* sp Ch4. Además, se estableció el potencial de la cepa en cuanto a la capacidad de crecimiento en condiciones de eutroficación (aumento de nutrientes como nitratos y fosfatos especialmente) para su posible escalado en aguas residuales industriales. Se tuvo como control el medio Bristol. Cada condición se evaluó por duplicado.

3.3.3.5 Estudio del efecto de agua residual en la cinética de crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella* sp Ch4. Para el estudio cinético de *Chlorella* sp Ch4 en medio con agua residual, se prepararon inóculos como se describe en 3.3.1.3 adicionando al medio Bristol 10% V/V de agua Residual. Se seleccionó el agua de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la Gerencia Refinería Barrancabermeja (PTAR GRB) para evaluar su influencia sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos en la microalga.

El inóculo se escaló a un reactor de 2 litros con 1,25 litros de medio y posteriormente a una columna de acrílico de 20 L de capacidad con 12 litros de medio (Bristol con agua residual al 10%) durante 4 días, con aire a 20 psi, luz constante entre 2000 y 4000 lux hasta que la cepa llegó a fase exponencial, monitoreando el crecimiento por recuento en cámara de Neubauer (Schoen, 1988) y densidad óptica a 675 nm (Arredondo y Voltolina, 2007).

Finalmente se inoculó al 10% V/V una columna de acrílico con fondo cónico de 220 litros de capacidad con 200 litros de volumen de trabajo; como medio de cultivo se utilizó medio Bristol con agua residual (PTAR GRB) diluida al 10%, aireación a 20 psi, luz constante entre 4000 y 5000 lux y muestreo cada 24 horas durante 12 días para determinación de biomasa seca neta (Sorokin,1973), determinación de pH y cuantificación de lípidos (Bligh y Dyer,1959)(Marsh y Weinstein (1966), construcción de curvas y análisis de resultados. El control se montó en iguales condiciones con medio Bristol, inyección de aire a 20 psi y luz constante entre 2000 y 4000 lux.

3.3.3.6 Análisis Estadístico de los datos. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado. Los resultados fueron analizados por ANOVA y prueba de t-student con un nivel de significancia a $P < 0,05$ utilizando el Software Statistica (Statsoft, Inc. Tulsa, OK).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AISLAMIENTO DE MICROALGAS DEL GÉNERO *Chlorella*

Con el propósito de aislar cepas nativas de microalgas del género *Chlorella*, se realizaron tres campañas de muestreo en sistemas lénticos (ciénagas) de la cuenca baja del Río Magdalena, sistemas de los que por históricos hidrobiológicos del área de Bioensayos del Laboratorio de Biotecnología se tenía certeza sobre la predominancia de *Chlorella* sp. Los sitios de muestreo se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo para el aislamiento de microalgas

Lugar/Sitio de muestreo	Puntos/ estaciones
Ciénaga Miramar	Frente a Lavanderas
	Frente a Club Infantas
	Frente a Club Miramar
	Puerta Principal
	Vertedero
Ciénaga Cuatro Bocas El Centro	Punto 1
	Punto 2
	Punto 3
Campo Cicuco	Ciénaga Cerrito Sur
	Ciénaga Cerrito B4
	Ciénaga Los Patos

De las muestras originales y aplicando las técnicas de aislamiento (ver 3.3.1.1) y subcultivo (ver 3.3.1.2) se recuperaron (7) cultivos unialgales más no axénicos que correspondían a microalgas del género *Chlorella* (Ver tabla 5). Con estos cultivos se aplicó la estrategia de reducción de carga bacteriana con telurito de potasio (procedimiento 3.3.1.2) y pases sucesivos de agotamiento hasta cultivo

unialgal. Una vez axénicos, los cultivos se utilizaron para el estudio de selección de la mejor cepa de *Chlorella* sp.

Tabla 5. Cepas de *Chlorella* sp aisladas

Código interno Cepa	Cepa	Origen de aislamiento	Medio de mantenimiento
Ch1	<i>Chlorella</i> sp	Lavanderas – Ciénaga Miramar	Medio Bristol
Ch2	<i>Chlorella</i> sp	Club Infantas – Ciénaga Miramar	Medio Bristol
Ch3	<i>Chlorella</i> sp	Vertedero – Ciénaga Miramar	Medio Bristol
Ch4	<i>Chlorella</i> sp	Puerta Principal GRB – Ciénaga Miramar	Medio Bristol
Ch5	<i>Chlorella</i> sp	Ciénaga Cuatro Bocas El Centro	Medio Bristol
Ch6	<i>Chlorella</i> sp	Desembocadura Caño La Cira - Ciénaga Cuatro Bocas	Medio Bristol
Ch7	<i>Chlorella</i> sp	Ciénaga Los Patos – Cicuco Depresión Momposina	Medio Bristol

En la Figura 4 se presenta un cultivo mixto de microalgas en proceso de aislamiento y en la Figura 5 (a), (b) y (c) cultivos unialgales.

Figura 4. Aislamiento primario en cultivo mixto

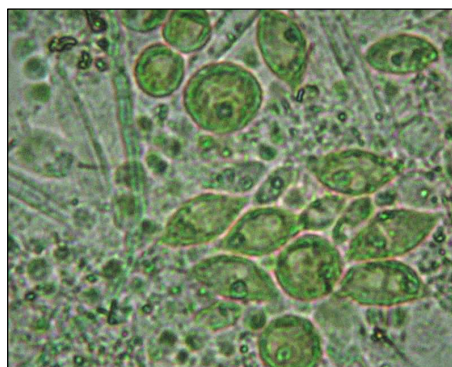
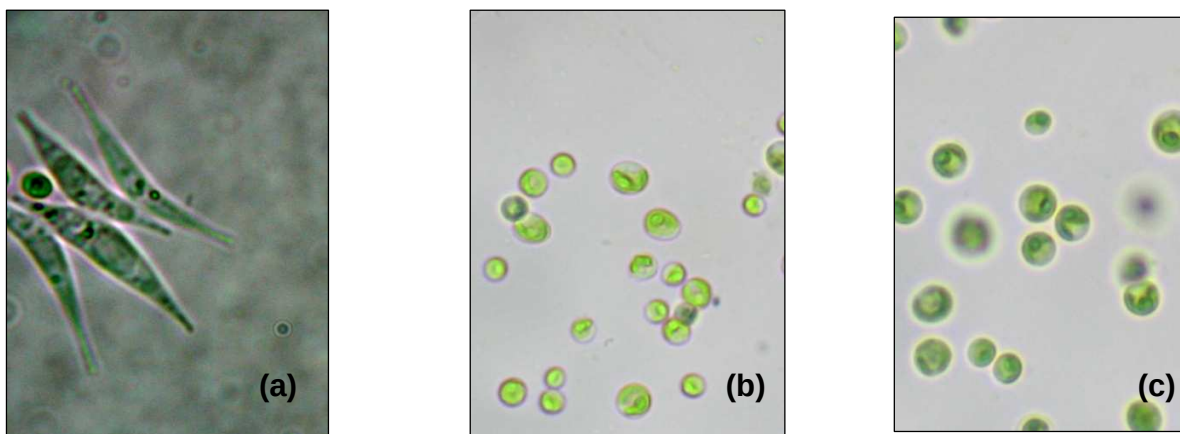


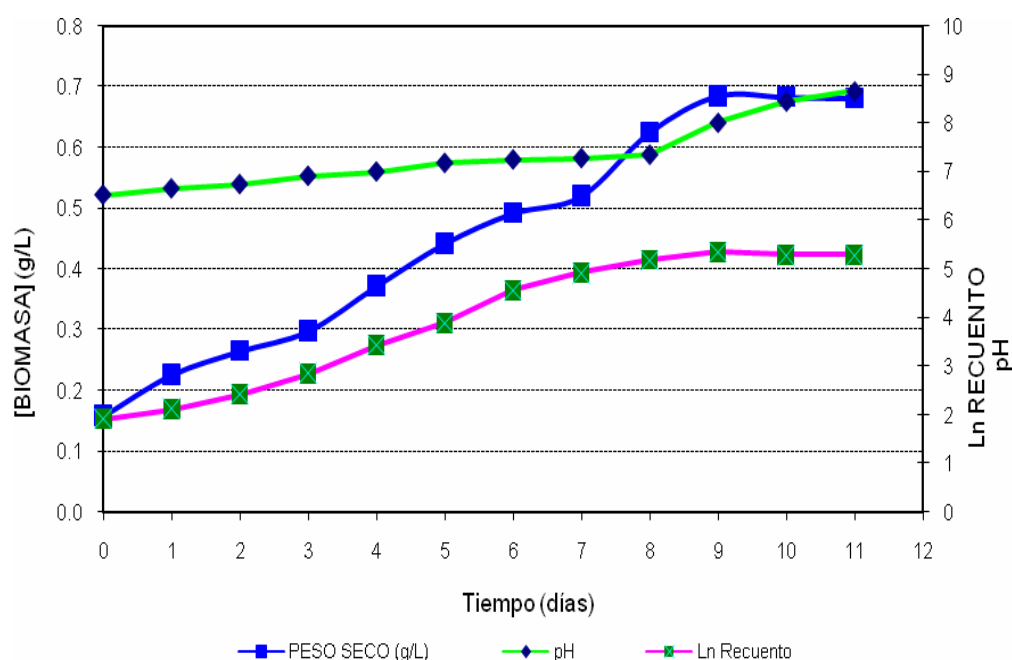
Figura 5. Cepas aisladas de *Scenedesmus* sp (a) y *Chlorella* sp (b) y (c).



4.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO PARA LA CEPA PATRÓN DE *Chlorella vulgaris*

Con el fin de evaluar las características de crecimiento de *Chlorella*, se realizaron ensayos en medio Bristol (Anexo 1) con una cepa de *C. vulgaris* cedida por la Universidad Autónoma Metropolitana de México. De acuerdo con la metodología experimental expuesta en 3.3.2.1, se obtuvo la cinética de crecimiento. Los resultados de la cinética de crecimiento se presentan en la Figura 6, que incluye recuento, pH y biomasa por peso seco.

Figura 6. Cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* (UAM) en Medio Bristol. Volumen 1,25L, 25±2 °C, pH 6,5, HR 63±3%, aire por burbujeo, luz 2000 - 2500 lux



En la figura 6 se observa que *C. vulgaris* alcanza su máximo crecimiento en el noveno día, con una concentración de biomasa de 0,685 g/L, tiempo a partir del cual se inicia la fase estacionaria del crecimiento celular que alcanzó 21×10^6 cél/mL. Lo anterior guarda correlación con lo publicado para el género ya que en cinéticas control de *C. vulgaris* cultivadas en medios similares al Bristol, se obtuvieron concentraciones de aproximadamente 10×10^6 cél/ml entre los días 9 y 11 de proceso. (Liu, Z. et al., 2007).

El comportamiento del recuento de la cepa de *C. vulgaris* mostró que las condiciones de cultivo consideradas para la cinética fueron favorables para el crecimiento y desarrollo de la microalga hasta alcanzar la fase estacionaria y estandarizar el tiempo de evaluación máximo de las siguientes experimentaciones.

A su vez en la Figura 6, se muestra la variación del pH en el cultivo. Considerando un pH inicial de 6,52, se observa la tendencia al aumento alcanzando valores de 8,66 a los 11 días de proceso con un ligero aumento entre los días 8 y 9. El aumento de la concentración de biomasa es directamente proporcional con el aumento del pH.

El aumento progresivo del pH está dentro de lo esperado ya que la asimilación del nitrato y su transformación en amoníaco basicifica el medio lo que conlleva un aumento en el pH (Brewer y Goldman, 1976) aun cuando en los resultados se observa que se mantiene dentro del rango óptimo publicado para el microalga, que se encuentra entre 7 y 8 (Richmond, 1980 op. cit.), el efecto amortiguador del medio Bristol contrarresta el aumento de pH.

Los parámetros cinéticos calculados con base en la cinética de crecimiento de *C. vulgaris* en Medio Bristol fueron:

Velocidad específica de crecimiento:	$\mu_{\text{máx}} (\text{d}^{-1})$	=	0,44
Tiempo de Generación:	Tg (días)	=	1,58
Biomasa total	Cel (gcél/L)	=	0,685

Los resultados obtenidos son similares a los reportados en la literatura en cuanto a la velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación, que en promedio es de $1,1 \text{ d}^{-1}$ para *C. vulgaris* (Salomon R, et al ,2003). Se alcanzó una concentración celular de 0,685 gcél/L el cual es un buen resultado considerando que las condiciones del reactor (erlenmeyer de 2 litros) no permitían el suministro óptimo de aire.

4.3 ESTUDIO DE SELECCIÓN DE LA MEJOR CEPA NATIVA DE *Chlorella* sp.

Se utilizaron las siete cepas de *Chlorella* sp aisladas en subcultivo. De acuerdo con la metodología experimental presentada en 3.3.2.2, se obtuvieron las cinéticas de crecimiento y de producción de lípidos en medio Bristol para cada cepa (Figuras 7 a 13) durante 11 días de cultivo. La biomasa fue monitoreada por recuento celular en cámara de Neubauer, lectura de absorbancia a 675 nm y determinación de peso seco. Sin embargo, para los cálculos cinéticos y de acuerdo con los criterios de selección establecidos, se utilizaron los resultados de biomasa determinada por peso seco. Las experiencias fueron realizadas en columnas de 2 litros de volumen aireadas por burbujeo.

Figura 7. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con *Chlorella* sp Ch1, columna de 2L, 25 ± 2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 2500 lux.

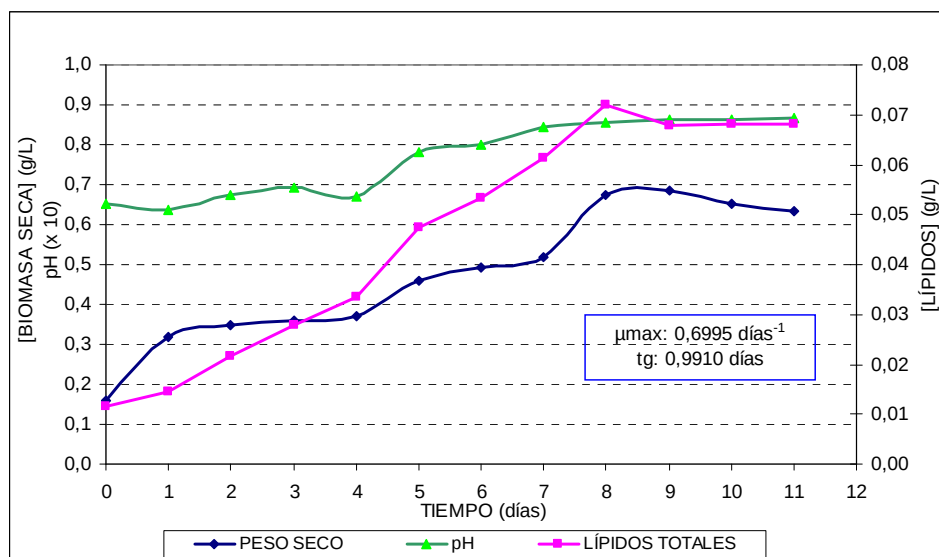


Figura 8. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con *Chlorella* sp Ch2, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 2500 lux.

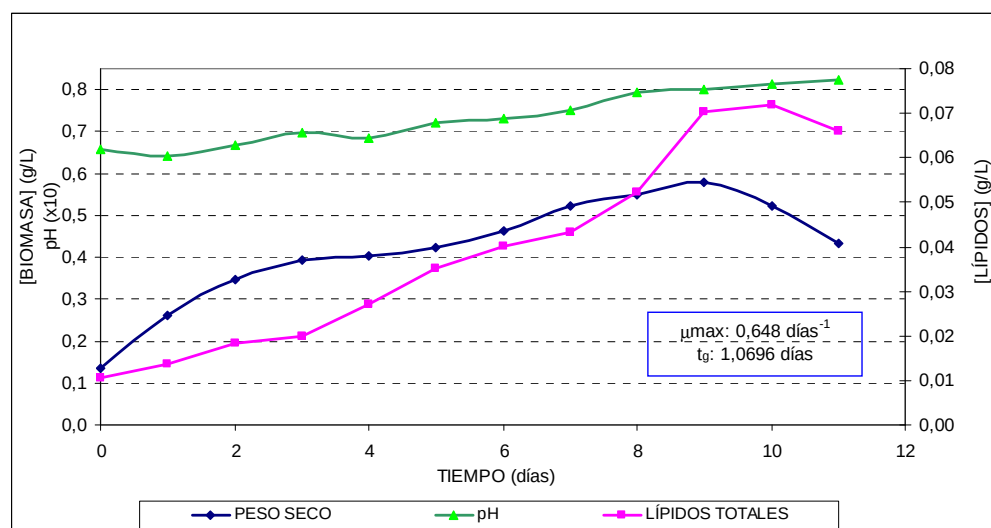


Figura 9. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con *Chlorella* sp Ch3, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 2500 lux.

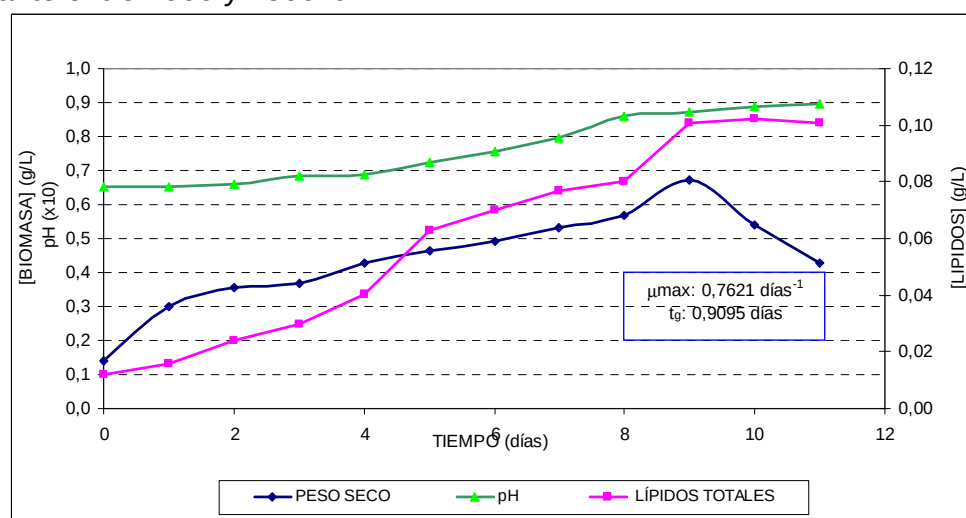


Figura 10, Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 2500 lux.

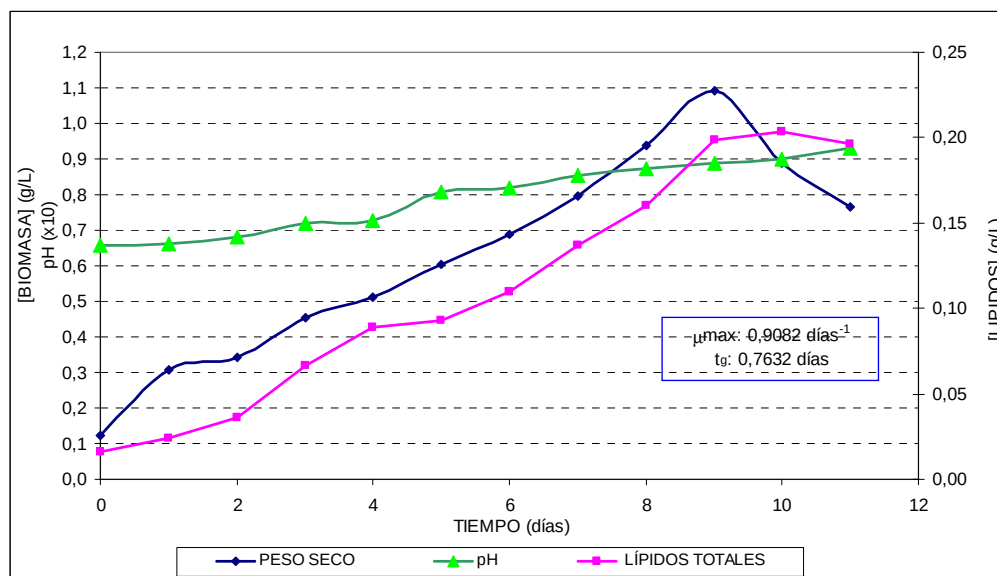


Figura 11. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con *Chlorella* sp Ch5, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 2500 lux.

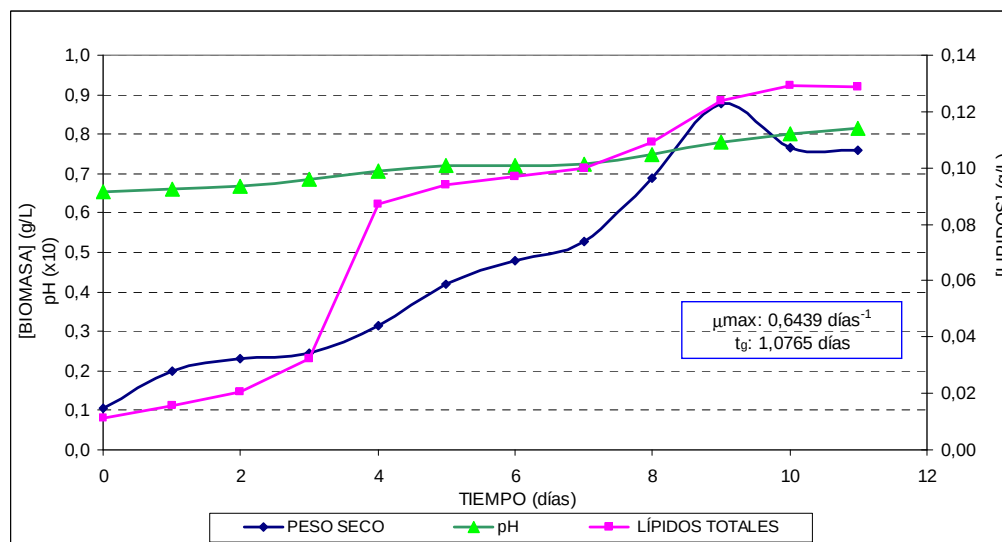


Figura 12. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con *Chlorella* sp Ch6, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 2500 lux.

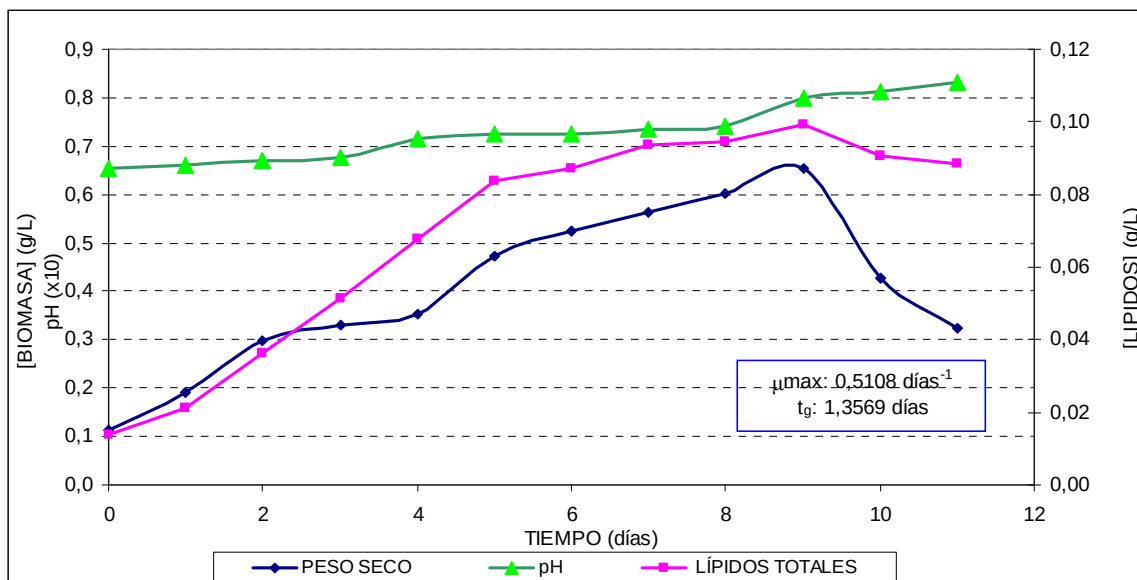
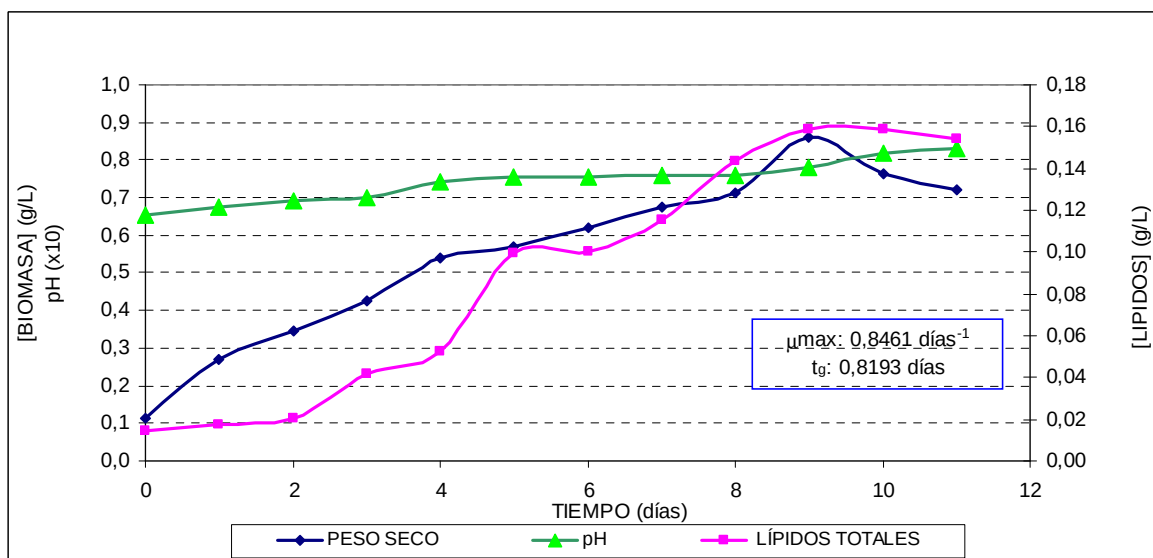


Figura 13. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol. Experiencia con *Chlorella* sp Ch7, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 2500 lux.



Ninguna curva de crecimiento mostró fase de adaptación (lag), las células entraron inmediatamente a fase exponencial en la que se mantuvieron la mayoría de las cepas hasta los días 8 y 10, Esto está asociado al hecho que los cultivos stock se realizaron en el mismo medio de cultivo (medio Bristol); cuando un inóculo se mantiene bajo condiciones similares a las de las corridas experimentales, la fase de adaptación es corta o ausente y puede alargarse cuando las condiciones son diferentes (Schimidell *et al.*, 2001).

Las velocidades específicas máximas de crecimiento fueron $0,9082 \text{ días}^{-1}$ para la cepa Ch4 y $0,8461 \text{ días}^{-1}$ para la cepa Ch7, para las demás cepas el rango estuvo entre $0,5108 \text{ días}^{-1}$ y $0,7621 \text{ días}^{-1}$ Estos valores estuvieron en el rango reportado para cepas de *Chlorella* en las que las velocidades específicas máximas de crecimiento estuvieron entre 0,5 y 2 días^{-1} (Reynolds, 1988).

Los menores tiempos de generación fueron 0,7632 días para la cepa Ch4 y 0,8193 días para la cepa Ch7. Considerando que se trata de cepas nativas a las que no se les ha sometido a estrés metabólico u otras condiciones de optimización experimental como adición de CO_2 o cambios en el medio de cultivo, fueron velocidades específicas de crecimiento acordes con lo publicado para cepas de *Chlorella*. El tiempo de generación para todas las cepas evaluadas fue menor a tres días, lo cual es comparable a lo publicado para *Chlorella kessleri* en medio Bristol (de Morais, 2007). Para los procesos productivos a escala es deseable que la velocidad específica de crecimiento de un organismo aumente y el tiempo de generación disminuya, de tal manera que el cultivo llegue a ser económicamente viable (Vonshak, *et al.*, 1982) .Lo anterior es importante como base de análisis del potencial de las cepas en evaluación.

El incremento de la biomasa es directamente proporcional al aumento de pH en los cultivos de microalgas debido a la solubilización y consumo de CO_2 y otros sustratos y a la producción de metabolitos (Grima, E. *et al.*, 1999). Las algas

exhiben una clara dependencia del pH y entre especies hay grandes variaciones en su respuesta a éste parámetro. La distribución de las formas químicas de carbono (CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-}) determina el pH circundante y el crecimiento y predominio de una determinada especie algal. (Richmon, 1980 op. cit.). Los valores máximos de pH para todas las cinéticas estuvieron dentro de los rangos publicados para la mayoría de cepas algales (7 a 8,5).

En todas las figuras se observa una clara asociación entre el crecimiento microalgal y la producción de lípidos, no encontrándose diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las dos curvas. En algunas cinéticas a pesar de que las células entran a fase estacionaria o de muerte, no se observa un efecto en la concentración de los lípidos que acumula la célula notándose con claridad, que algunas de ellas como es el caso de *Chlorella* sp Ch5 y *Chlorella* sp Ch7 los lípidos continúan en aumento o se mantienen a pesar de la disminución de la biomasa. Similares resultados se obtuvieron en especies de *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*, las cuales en cultivo con urea y nitrato, el contenido celular en lípidos aumenta a lo largo del periodo de crecimiento. En la fase estacionaria el agotamiento de los nutrientes da lugar a la acumulación de carbono en forma de compuestos de reserva, almacenando en el caso de *I. galbana*, una gran cantidad de lípidos en condiciones no óptimas de crecimiento (Fidalgo, 1993). En la tabla 6, se presentan los parámetros cinéticos calculados para todas las cepas nativas de *Chlorella* sp evaluadas.

Tabla 6. Parámetros cinéticos del estudio de selección de la mejor cepa nativa de *Chlorella* sp

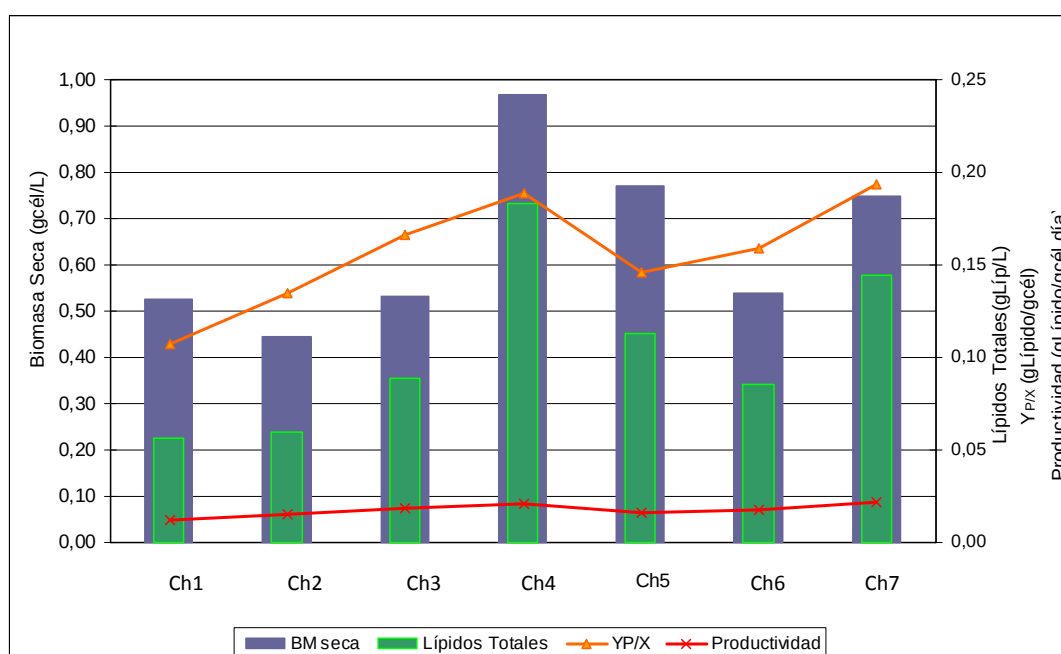
CEPA	Tiempo (días)	Prod celular neta (gcél/L)	Prod Lípidos neta (gLip/L)	μ_{max} (día ⁻¹)	t_g (días)	Q_x (gcél/L. día)	Q_p (gLip/L. día)	$Y_{p/x}$ (gLip/gcél)	q_p (gLip/gcél. día)	Contenido Lípidos(% BM)
Ch1	11	0,527	0,0564	0,6995	0,9910	0,0586	0,0063	0,1071	0,0119	10,71
Ch2	11	0,444	0,0597	0,6480	1,0696	0,0493	0,0066	0,1344	0,0149	13,44
Ch3	11	0,533	0,0886	0,7621	0,9095	0,0593	0,0098	0,1660	0,0184	16,60
Ch4	11	0,968	0,1827	0,9082	0,7632	0,1076	0,0203	0,1888	0,0210	18,88
Ch5	11	0,772	0,1128	0,6439	1,0765	0,0858	0,0125	0,1461	0,0162	14,61
Ch6	11	0,540	0,0859	0,5108	1,3569	0,0600	0,0095	0,1590	0,0177	15,90
Ch7	11	0,747	0,1446	0,8461	0,8193	0,0830	0,0161	0,1935	0,0215	19,35

La mayor productividad volumétrica (Q_x) la obtuvo la cepa *Chlorella* sp Ch4 alcanzando 0,1076 g cél/L.día. La producción celular estuvo entre 0,444 g/L para la cepa Ch2 y 0,968 g/L para la cepa Ch4. Se obtuvo casi un gramo por litro de biomasa con la cepa Ch4 a los 9 días de proceso sin suministro adicional de CO₂ ya que el carbono disponible en el cultivo corresponde al disuelto en el aire inyectado (aproximadamente 0,038%), estos resultados son similares a los obtenidos con cepas de *C. kessleri* en medio Bristol para los que se reportaron datos de 1,45 g/L de biomasa y productividades volumétricas de 0,090 g cél/L.día (de Morais, 2007, op. cit.).

En cuanto a la productividad volumétrica en lípidos (Q_p) se tiene que la cepa *Chlorella* sp Ch4 presenta el máximo valor de 0,0203 gLip/L.día. Con esta cepa se obtuvo el segundo mejor rendimiento de biomasa en lípidos ($Y_{p/x}$) alcanzando un valor de 0,1888 gLip/gcél y la segunda más alta producción en lípidos con un 18,88%. Los resultados obtenidos se relacionan con lo publicado, ya que especies de *Chlorella* en condiciones basales producen entre un 14 y un 30% de lípidos transformables en biodiesel (Illman, et al 2000, Spolaore, et al., 2006 op. cit.) los cuales pueden aumentar optimizando las condiciones de crecimiento mediante

estrategias de privación de nitrógeno, limitación de fosfato, alta salinidad entre otras (Liu Z, *et al* 2007 op. cit.). En la figura 14 se presenta un comparativo entre los parámetros cinéticos asociados a Biomasa y Lípidos para todas las cepas evaluadas.

Figura 14. Principales parámetros cinéticos para las cepas de *Chlorella* sp en el estudio de selección de la mejor cepa nativa. Experiencia con *Chlorella* sp Ch7, columna de 2L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 2500 lux.



La cepa de *Chlorella* sp Ch4 evidenció la mejor velocidad específica de crecimiento, el menor tiempo de generación, la mejor producción de biomasa y lípidos, la segunda mejor productividad específica en lípidos con un valor de 0,0210 gLíp/gcél.día y el segundo mejor contenido de lípidos en biomasa con un 18,88% por lo que se seleccionó para las evaluaciones de variables críticas.

4.4 EVALUACIÓN DE VARIABLES CRÍTICAS DE PROCESO CON LA CEPA *Chlorella* sp Ch4

4.4.1 Selección del medio de cultivo para el crecimiento y producción de lípidos utilizando la cepa *Chlorella* sp Ch4. Se estudió el efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento, producción de lípidos y pH utilizando la cepa de *Chlorella* sp Ch4 (Figuras 15 a 18). Se evaluaron los medios de cultivo indicados en el numeral 3.3.3.1 y presentados en el Anexo 3. Los medios de cultivo se escogieron con base en las referencias bibliográficas asociadas a cultivos de microalgas en particular para el crecimiento de cepas de *Chlorella* (de Morais, 2007; Gouveia, *et al.*, 2009; Mora, *et al.*, 2004; Chacón, *et al.*, 2004; Chang, 2003; Chevalier, *et al.*, 2000) y la posible influencia de micronutrientes o elementos trazas, los cuales no fueron evaluados individualmente sino en formulación final (medios completos reportados por los autores) para la selección del medio de cultivo a utilizar en las fermentaciones en reactores de 12, 20 y 220 litros.

Figura 15. Cinética de crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella* sp Ch4 en medio Bristol sin modificaciones Columnas aireadas de 12 L con 8L de medio, 25±2°C, HR 63±3%, aireación 1 vvm, luz constante 20 00 - 4000 lux

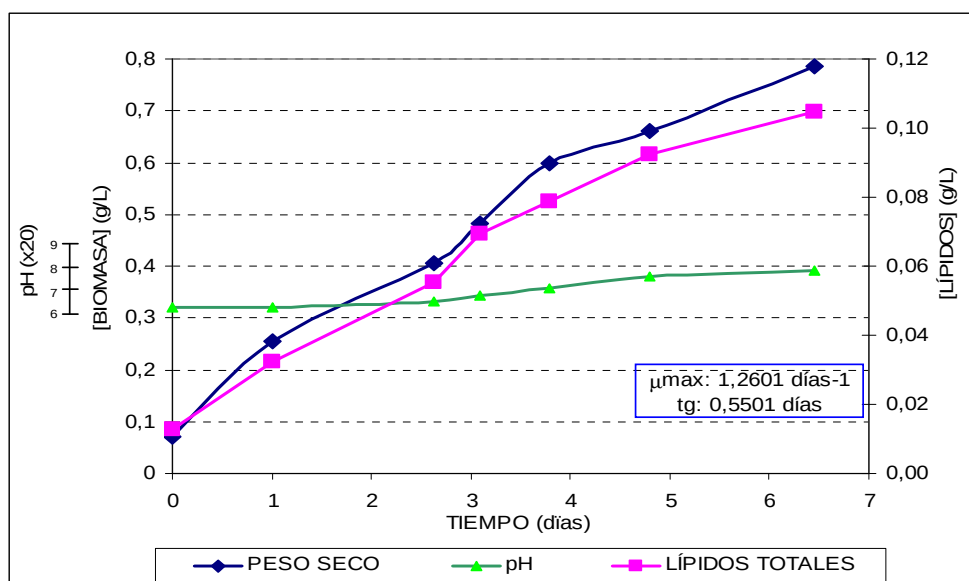


Figura 16. Cinética de crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella* sp Ch4 en medio BG-11. Columnas aireadas de 12 L con 8L de medio, 25±2°C, HR 63±3%, aireación 1 vvm, luz constante 2000 - 4000 lux.

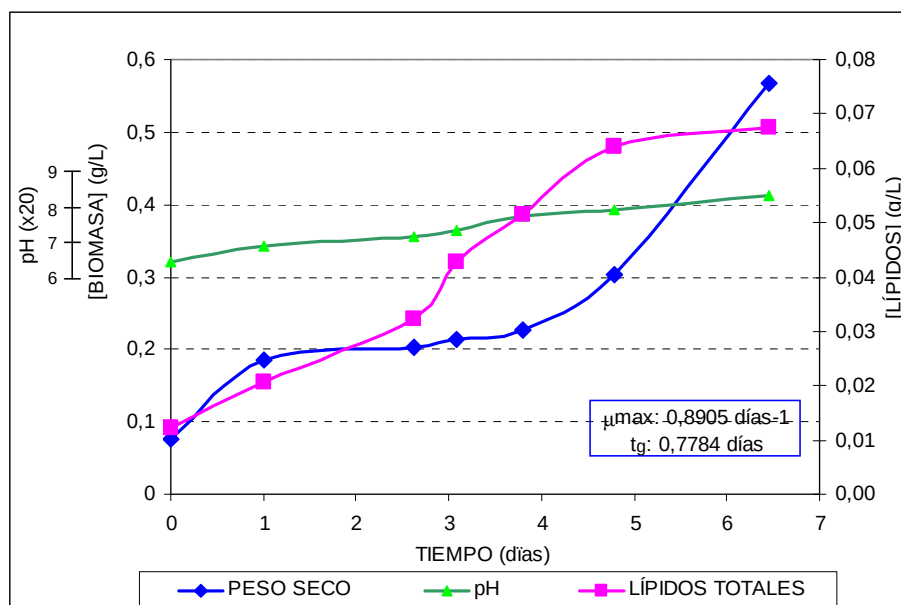


Figura 17. Cinética de crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella* sp Ch4 en medio Bristol 2X. Columnas aireadas de 12 L con 8L de medio, 25±2°C, HR 63±3%, aireación 1 vvm, luz constante 2000 - 4000 lux.

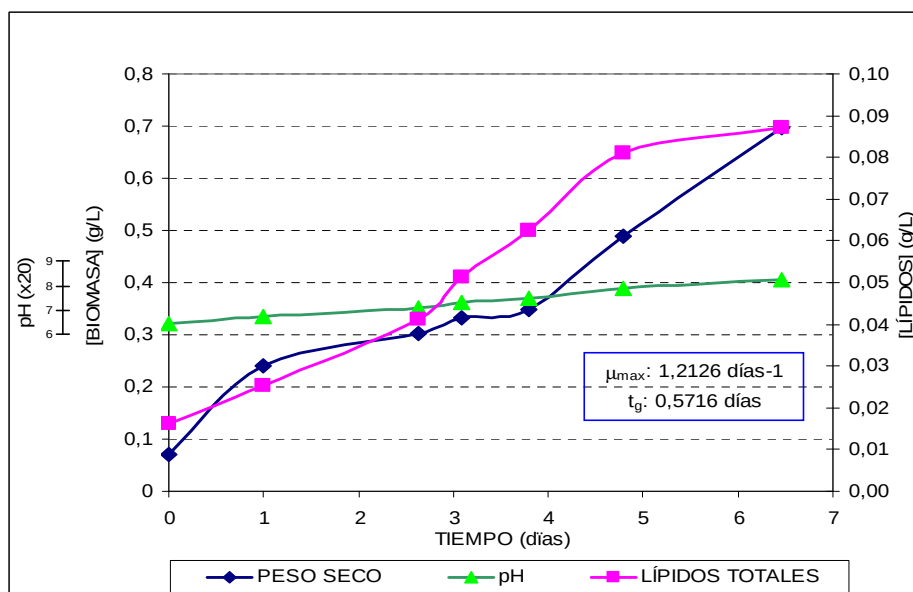
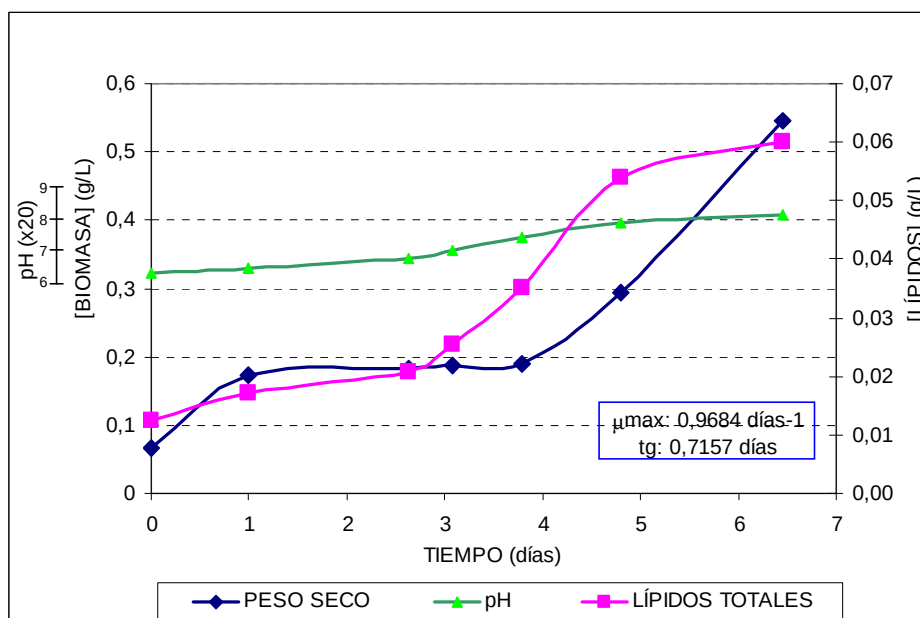


Figura 18. Cinética de crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella* sp Ch4 en medio AL. Columnas aireadas de 12 L con 8L de medio, 25±2°C, HR 63±3%, aireación 1 vvm, luz constante 2000 - 4000 lux.



Los resultados experimentales del crecimiento celular en los medios de cultivo estudiados mostraron que las velocidades específicas máximas de crecimiento para *Chlorella* sp Ch4 fueron 1,2126 días⁻¹ en Medio Bristol 2X y 1,2601 días⁻¹ en medio Bristol. Los menores tiempos de generación fueron 0,55 días para la cepa en medio Bristol sin modificaciones y 0,57 días para la cepa en medio Bristol 2X, resultados comparables a los resultados reportados en la literatura en condiciones de laboratorio, en cuanto a la velocidad específica de crecimiento y tiempo de generación para *C. vulgaris*, que en promedio es de 1,1 d⁻¹ (Salomon, et al., 2003 op. cit.; Gouveia, 2009 op. cit.; Xiong, et al., 2008 op. cit.). No se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) para el crecimiento celular entre el medio Bristol y el medio Bristol 2X.

Los resultados para estos dos parámetros cinéticos mostraron un mejor desempeño de *Chlorella* sp Ch4 en el medio Bristol sin modificación comparado

con lo obtenido en la cinética de selección en el numeral 4.3 ya que en el sistema de cultivo actual (columnas aireadas de 12 L con 8 L de medio) se optimiza la inyección y distribución de aire y la configuración del sistema de iluminación es mejor. Comparando estos dos casos, la $\mu_{\max}$ aumentó de 0,9082 días⁻¹ a 1,2601 días⁻¹ y el t_g disminuyó de 0,76 días a 0,55 días, lo que muestra el efecto positivo que tienen el escalado y el tipo de reactor que se utilizan (Sobczuk, 2006; Chisty, 2006 op. cit.; Borowitzka, 1999(a))

Tal y como se evidenció en las cinética de selección del numeral 4.3, la curva de crecimiento de *Chlorella* sp Ch4 en medio Bristol sin modificación no mostró fase de adaptación (lag) y para esta evaluación tampoco se hizo presente en el medio Bristol 2X. En los medios BG-11 y AL, luego del primer día de cultivo las células entraron a una aparente fase de latencia que duró hasta el cuarto día cuando inició la fase exponencial del crecimiento, lo que podría estar sustentado en la deficiencia de fósforo y azufre de los medios que ocasiona retardo del crecimiento y bloqueo de la división celular.

El pH se mantuvo en ascenso en todas las cinéticas con valores máximos entre 7,83 para el medio Bristol sin modificaciones, seguido del medio Bristol 2X (8,12), el medio AL (8,14) y 8,25 en el medio BG-11 lo que considerando un pH de arranque de 6,5 para todas las fermentaciones es un comportamiento normal que ya se explicó anteriormente. Estos valores de pH se encuentran dentro de los rangos óptimos para el crecimiento de las clorofíceas que está entre 7 y 9 (Abalde *et al.*, 1995 op. cit.).

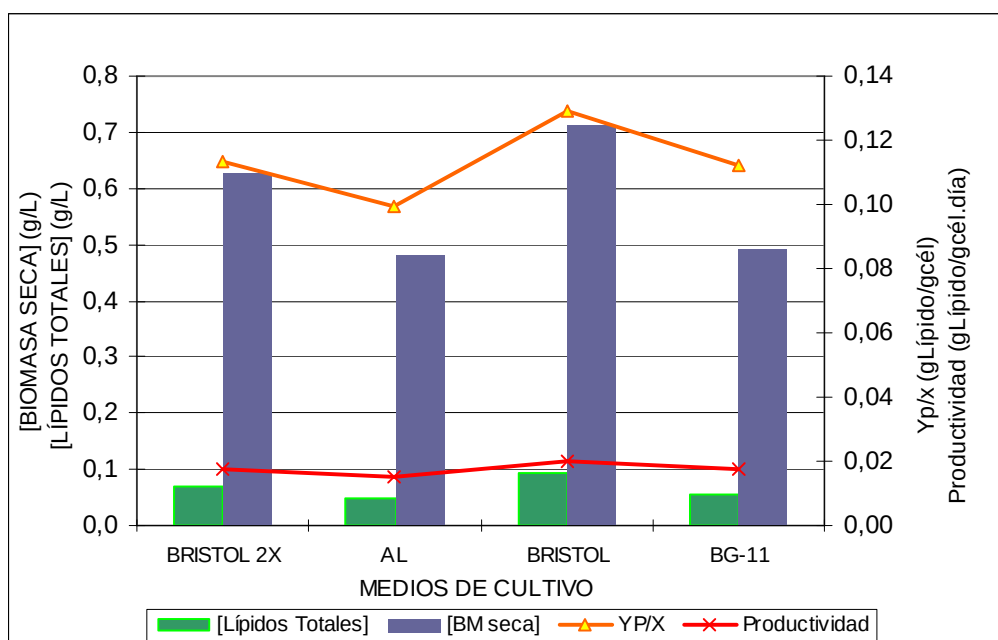
En la tabla 7 se presentan los parámetros cinéticos calculados para las cinéticas con *Chlorella* sp Ch4 en los medios de cultivo Bristol 2X, Algal, BG-11 y Bristol sin modificaciones.

Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos en la evaluación de medios de cultivo con la cepa de *Chlorella* Ch4 en reactores de 12 litros.

Medio de Cultivo	Tiempo (días)	Prod celular neta (gcél/L)	Prod Lípidos neta (gLip/L)	μ_{max} (día ⁻¹)	t_g (días)	Q_x (gcél/L.día)	Q_p (gLip/L.día)	$Y_{P/X}$ (gLip/gcél)	q_p (gLip/gcél.día)	Contenido Lípidos (%cél)
Bristol										
2X	7	0,6265	0,0709	1,2126	0,5716	0,0970	0,0110	0,1132	0,0175	11,32
Algal	7	0,48	0,0476	0,9684	0,7157	0,0743	0,0074	0,0992	0,0154	9,92
BG-11	7	0,4923	0,0551	0,8905	0,7784	0,0762	0,0085	0,1119	0,0173	11,19
Bristol	7	0,714	0,0920	1,2601	0,5501	0,1106	0,0142	0,1288	0,0199	12,88

En la figura 19 se presenta un comparativo entre los parámetros cinéticos asociados a Biomasa y Lípidos para todas las cepas evaluadas.

Figura 19. Comparativo de parámetros cinéticos con la cepa *Chlorella* sp Ch4 en los medios de cultivo evaluados. Columnas aireadas de 12 L con 8L de medio, 25±2°C, HR 63±3%, aireación 1 vvm, luz constante 20 00 - 4000 lux.



Con base en las productividades volumétricas (Q_x) (Q_p) y específica (q_p), así como en el rendimiento de biomasa en lípidos ($Y_{p/x}$), se determinó que los medios Bristol y Bristol 2X favorecían notablemente el crecimiento y la producción de lípidos con el microalga *Chlorella* sp Ch4 en las condiciones de cultivo aplicadas y no se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre uno y otro medio para los dos parámetros. La composición de los medios Bristol difiere en esencia en la cantidad de los nutrientes, por lo que se establece que el comportamiento de los dos medios Bristol es equivalente, sin un aumento en los rendimientos y productividades con el doble de sales, por lo que se selecciona el medio Bristol sin modificaciones como el medio óptimo para crecimiento de *Chlorella* sp Ch4 para las siguientes evaluaciones.

4.4.2 Evaluación de la modalidad del pH utilizando la cepa *Chlorella* sp Ch4.

Se estudió el efecto del pH inicial sobre el crecimiento y producción de lípidos con la cepa *Chlorella* sp Ch4 a nivel de columnas aireadas de 12 litros.

Para el estudio se utilizó el medio Bristol el cuál fue seleccionado en la prueba de medios de cultivo y las condiciones iniciales para los fermentadores fueron pH de 6,5, 7,5 y 8,5 y un cultivo control que se mantuvo a pH 8 controlado, con ajuste manual cada 12 horas adicionando H_2SO_4 10 N. El tiempo total de fermentación fue de 7 días. Las condiciones experimentales se presentan en 3.3.3. En las figuras 20 a 23 se presentan las cinéticas de crecimiento y producción de lípidos con *Chlorella* sp Ch4 en cada una de las condiciones de pH.

Figura 20. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol a pH inicial de 6,5. Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.

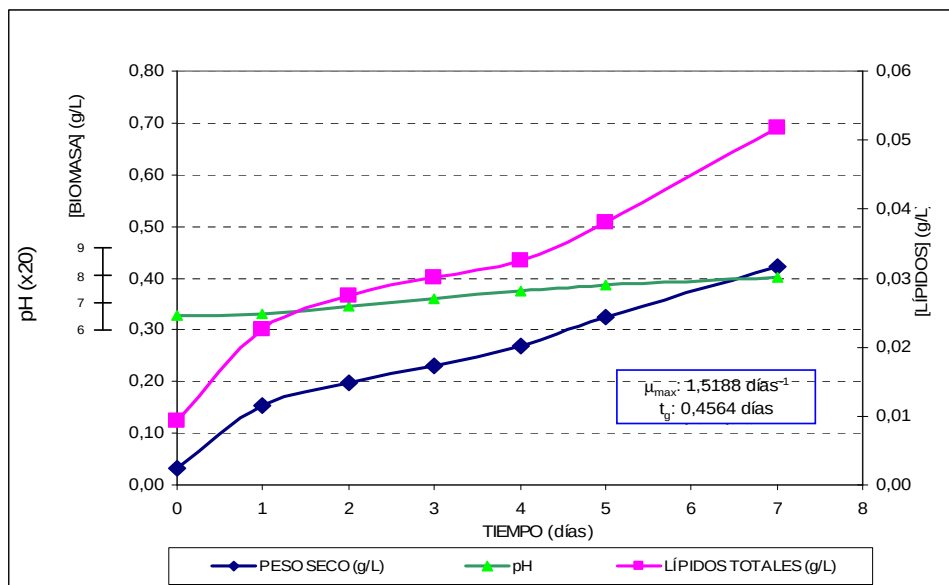


Figura 21. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol a pH inicial de 7,5 . Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.

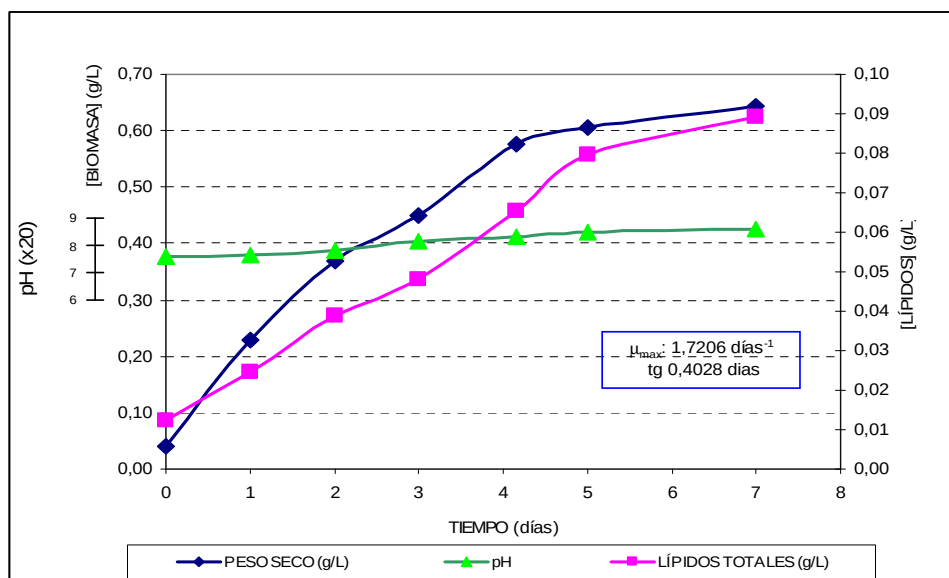


Figura 22. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol a pH inicial de 8,5. Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.

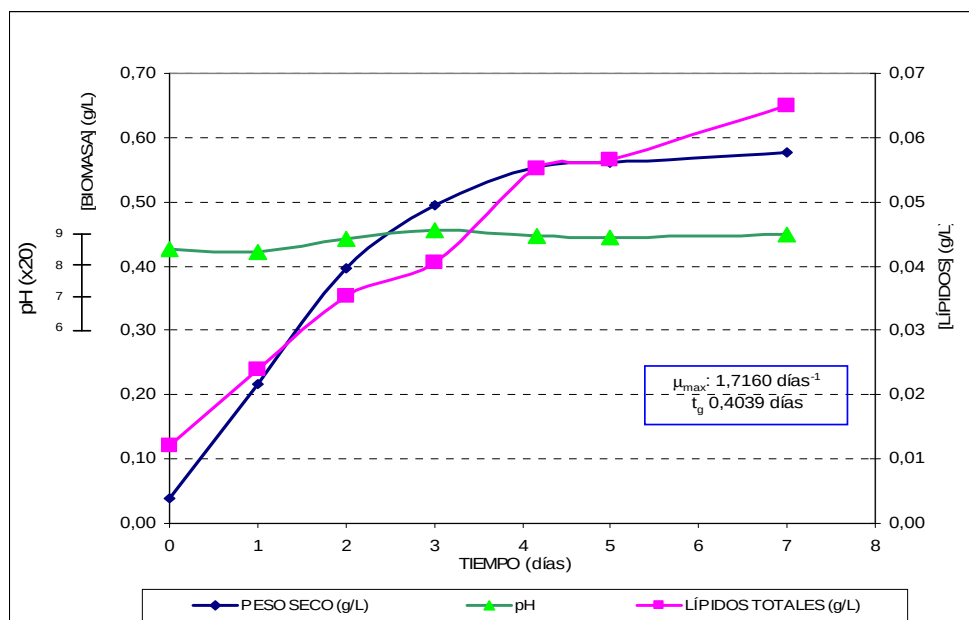
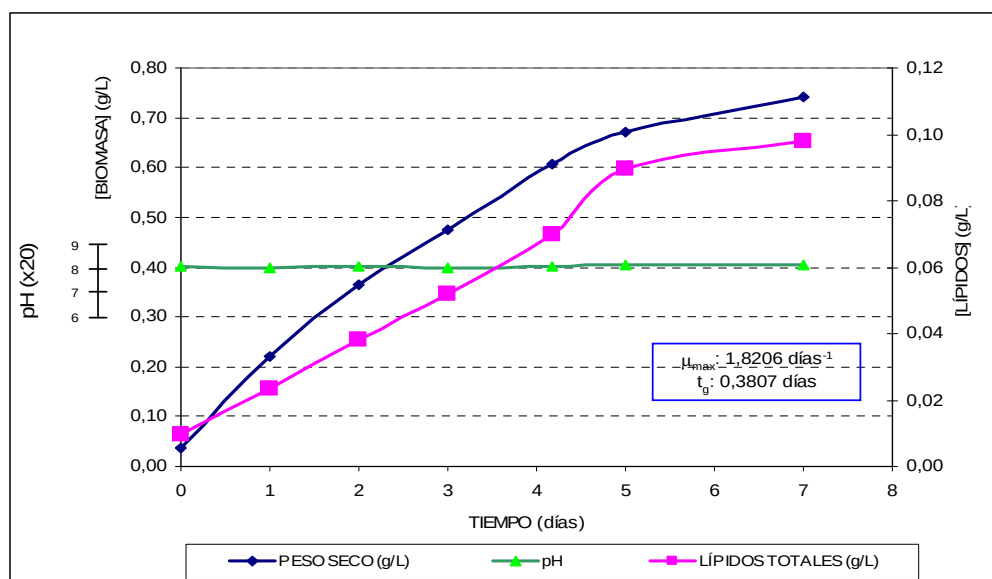


Figura 23. Cinética control de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol a pH constante de 8,0, Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4 000 lux.



Las velocidades específicas máximas de crecimiento para *Chlorella* sp Ch4 fueron 1,8206 días⁻¹ para la cinética con pH inicial de 7,5 y 1,7206 días⁻¹ para la cinética con pH inicial de 8,5. Los menores tiempos de generación fueron 0,3807 días para la cinética con pH inicial de 7,5 y 0,4028 días para la cinética con pH inicial de 8,5. Los resultados para estos dos parámetros cinéticos mostraron un mejor desempeño de *Chlorella* sp Ch4 en el medio Bristol con pH inicial de 7,5 comparado con la mejor cinética obtenida hasta el momento que corresponde a la del medio Bristol en la prueba de selección de medios de cultivo ya que la $\mu_{\max}$ aumentó de 1,2601 días⁻¹ a 1,8206 días⁻¹ y el t_g disminuyó de 0,5501 días a 0,3807 días. En cuanto a la cinética control a pH 8,0 estos parámetros cinéticos estuvieron muy cercanos a los de la cinética a pH inicial en 7,5.

Se observa en las figuras el incremento de la biomasa asociado al aumento del pH en todos los experimentos sin control. La más alta producción celular se obtuvo en la cinética con pH inicial de 7,5 con 0,7071 gcél/L y la más baja producción celular en la cinética con pH inicial de 6,5 con 0,3896 gcél/L. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de *Chlorella* sp Ch4 ($P < 0,05$) entre las cinéticas a pH inicial de 7,5 y 8,5.

La variación del pH dentro de rangos establecidos es la estrategia de elección siempre y cuando no superen los límites tolerables por la célula. Esto ha sido reportado en *Chlorella* en estudios sin control del pH en los que el aumento del pH arriba de 9 o su caída por debajo de 6, afecta sustancialmente el crecimiento de las microalgas (Dorling *et al.*, 1997 op. cit.).

El pH del cultivo, como se comentó anteriormente, depende de la capacidad tampón del medio; los tampones utilizados suelen ser orgánicos y provocan un aumento del crecimiento bacteriano (Fábregas, *et al.*, 1993). La utilización de tampones se evita con el burbujeo del cultivo con aire o con CO₂, especialmente en el último caso, cuando se desea obtener alta densidad celular. Las microalgas

que crecen a concentraciones de CO₂ cercanas a las disueltas en el aire (0,038%) tienen alta afinidad por el CO₂, la que se ve favorecida por pH entre 8,2 y 8,7 lo que corrobora el mejor desempeño de la cepa *Chlorella* sp Ch4 en el medio a pH de 7,5 y que se torna adversa a pH superiores a 8,9 (Azov, 1982 op. cit.) esto debido a que como se explicó anteriormente, el crecimiento fotosintético de las microalgas provoca el aumento del pH del medio y si éste aumenta hasta 9 el carbonato puede precipitar, lo que conlleva a la retirada de nutrientes del medio. (Abalde *et al.*, 1995 op. cit.), a pH 9,5 se afecta la fotosíntesis algal ya que es un factor determinante para la concentración de CO₂ libre y porque disminuye la afinidad del alga hacia el CO₂. (Azov, 1982 op. cit.).

Teniendo en cuenta que el rango de pH apropiado para el crecimiento de la mayoría de las especies microalgales está entre 7 y 8,7 se explica el que una cinética que comience en un pH por debajo de éste valor no brindará las condiciones óptimas para el crecimiento celular. Lo anterior se cumple para la cinética a pH inicial de 6,5 en la que se obtuvo menor producción celular (0,3896 g/L). Analizando ésta gráfica se encuentra que el pH del medio de cultivo se mantuvo por debajo de 7 durante los 3 primeros días de fermentación y el crecimiento aunque fue paralelo al aumento del pH no fue el óptimo debido a la menor disponibilidad de los nutrientes.

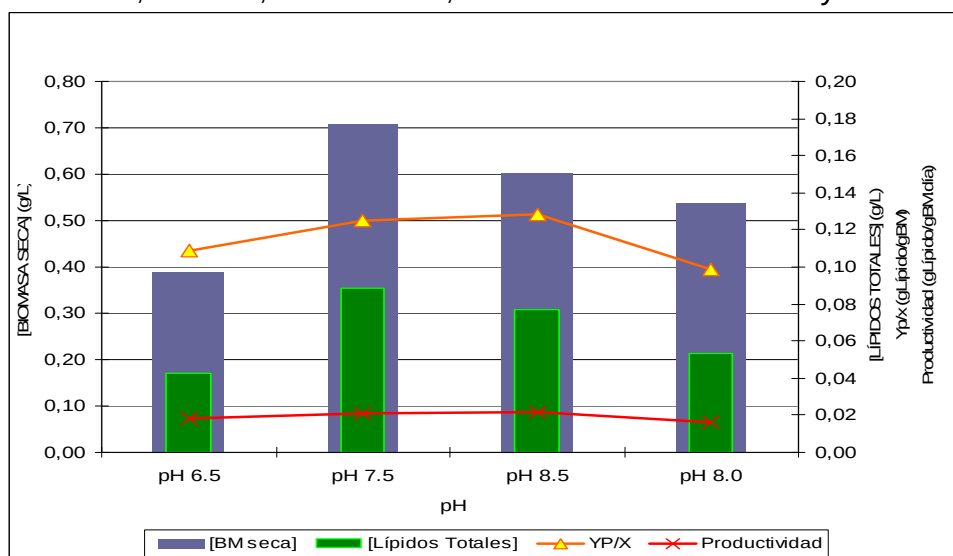
No se evidenció fase de adaptación (lag) en ninguna de las curvas de crecimiento de *Chlorella* sp Ch4 en medio Bristol para las condiciones iniciales de pH evaluadas. Sin embargo, el comportamiento de la cepa en el medio con pH inicial 6,5 mostró un crecimiento menos eficiente de la cepa corroborado por los parámetros cinéticos como ya se explicó. En la tabla 8 se presentan los parámetros cinéticos calculados para todas las fermentaciones.

Tabla 8. Parámetros cinéticos obtenidos en la evaluación de modalidad de pH con la cepa de *Chlorella* Ch4 a 7 días de crecimiento en columnas aireadas de 12 litros.

Modalidad	Tiempo	Prod. celular	Prod. Lípidos	μ_{max}	t_g	Q_x	Q_p	$Y_{P/X}$	q_p	Contenido
pH	(días)	neta	neta	(día ⁻¹)	(días)	(gcél/L. día)	(gLip/L.día)	(gLip/gcél)	(gLip/gc él.día)	Lípidos (%cél)
		(gcél/L)	(gLip/L)							
Libre										
pH 6,5	7	0,3896	0,0425	1,5188	0,4564	0,0649	0,0071	0,1090	0,0182	10,90
Libre										
pH 7,5	7	0,7071	0,0883	1,8206	0,3807	0,1179	0,0147	0,1249	0,0208	12,49
Libre										
pH 8,5	7	0,6020	0,0772	1,7206	0,4028	0,1003	0,0129	0,1282	0,0214	12,82
Control										
pH 8,0	7	0,5390	0,0531	1,7160	0,4039	0,0898	0,0088	0,0985	0,0164	9,85

En la figura 24 se presenta un comparativo entre los parámetros cinéticos asociados a Biomasa y Lípidos para todas las cepas evaluadas.

Figura 24. Comparativo de parámetros cinéticos (Biomasa y lípidos) de *Chlorella* sp Ch4 a diferentes condiciones iniciales de pH. Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.



Con base en las productividades volumétricas (Q_x) (Q_p) y específica (q_p), así como en el rendimiento de biomasa en lípidos ($Y_{p/x}$), se determinó, que un pH inicial entre 7,5 y 8,5 favorecía notablemente el crecimiento y la producción de lípidos ($P < 0,05$) con el microalga *Chlorella* sp Ch4 en las condiciones de cultivo aplicadas.

4.4.3 Evaluación del efecto de la urea y el nitrato de sodio como fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de lípidos por *Chlorella* sp Ch4.

Se evaluó el efecto de las fuente de nitrógeno: nitrato de sodio y urea comercial sobre el crecimiento y producción de lípidos con la cepa *Chlorella* sp Ch4 a nivel de columnas aireadas de 12 litros en cinéticas a 7 días. Con base en el cálculo del contenido de nitrógeno en el medio Bristol que contiene 0,25 g/L de nitrato de sodio, se realizó el ajuste equivalente del nitrógeno aportado por la urea (0,098 g/L). Las condiciones experimentales se presentan en 3.3.3.3 y el tiempo total de fermentación fue de 7 días. En las figuras 25 y 26 se presentan las cinéticas de crecimiento y producción para *Chlorella* sp Ch4 en medio Bristol con nitrato y urea como fuentes de nitrógeno.

Figura 25. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol con Urea como fuente de nitrógeno. Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L, 25 ± 2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 200 0 y 4000 lux.

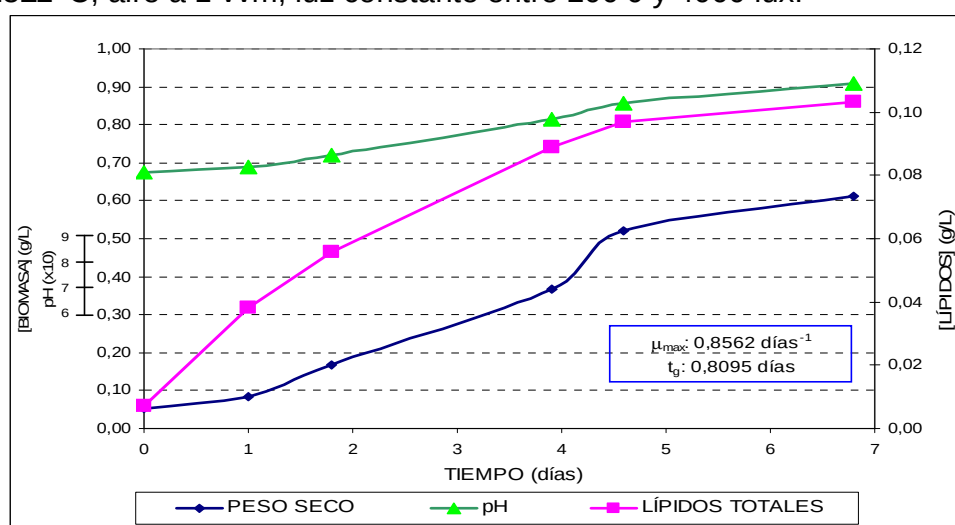
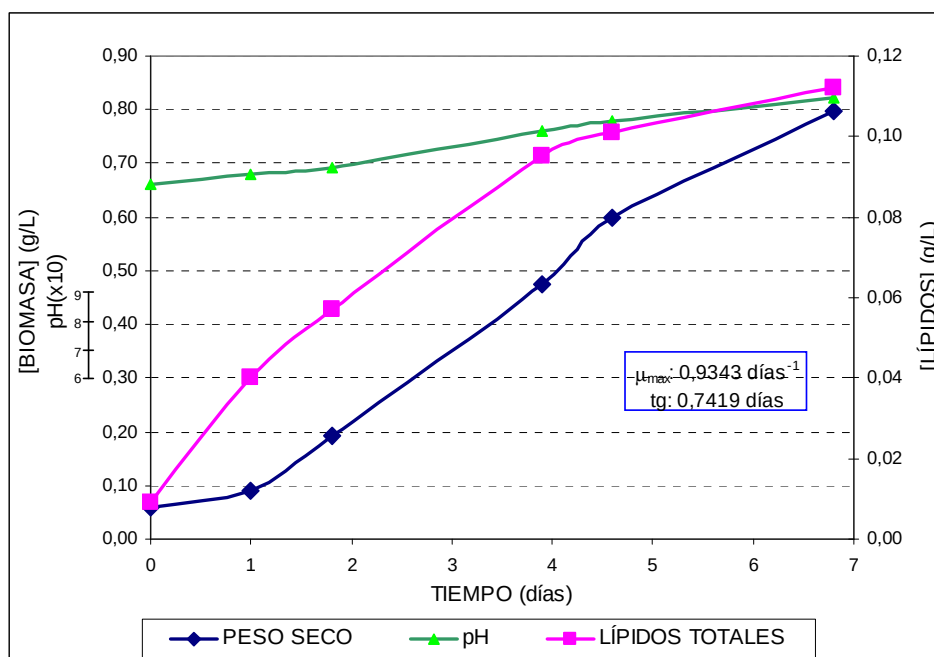


Figura 26. Cinética de crecimiento y Producción de Lípidos en el medio Bristol con Nitrato como fuente de nitrógeno. Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 200 0 y 4000 lux.



Para la cinética de *Chlorella* sp Ch4 en medio con nitrato se obtuvo la mejor velocidad específica máxima de crecimiento con un valor de 0,9343 días⁻¹ y el menor tiempo de generación con 0,7419 días. Está reportado que en cinéticas con *C. vulgaris* en medio Bristol con nitrato se obtuvieron velocidades máximas específicas de crecimiento de 0,25 días⁻¹ y de 0,35 días⁻¹ para *C. kessleri* (de Moraes, 2007 op. cit.) que son bajas comparadas con las obtenidas y que pueden estar asociadas a la configuración de los reactores. Para este proyecto se utilizaron columnas tubulares aireadas mediante sistema airlift, facilidades para desfogue controlado de oxígeno y sellos adecuados para evitar la pérdida por evaporación, lo que garantiza buena distribución de los nutrientes y facilidades en el muestreo.

En las cinéticas se observa la asociación entre el crecimiento de *Chlorella* sp Ch4 y la acumulación de lípidos a lo largo de los 7 días de crecimiento.

Se observó la relación entre el crecimiento y el aumento del pH. El medio Bristol con urea tuvo un aumento marcado llegando a 9,1 al cabo de 7 días de crecimiento, comparado con el medio Bristol con nitrato que alcanzó un pH de 8,22 en el mismo tiempo. El aumento del pH en el medio con urea puede estar asociado a la presencia de amoníaco por desdoblamiento de la urea (por acción de la enzima ureasa) que basifica el medio, sin llegar a afectar el crecimiento celular y la producción de lípidos, por lo menos, en las condiciones de cultivo y tiempo de proceso evaluados.

Tal y como se observa en la tabla 9, se obtuvo menor producción de biomasa en el medio con urea (0,5582 g/L) que en el medio con nitrato (0,7389 g/L). Producciones de biomasa entre 0,9 y 1,3 g/L han sido reportadas para cepas de *C. kessleri* y *C. vulgaris* en medio Bristol con nitrato (de Morais, 2007 op. cit.). No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) de *Chlorella* sp Ch4 en una u otra fuente nitrogenada.

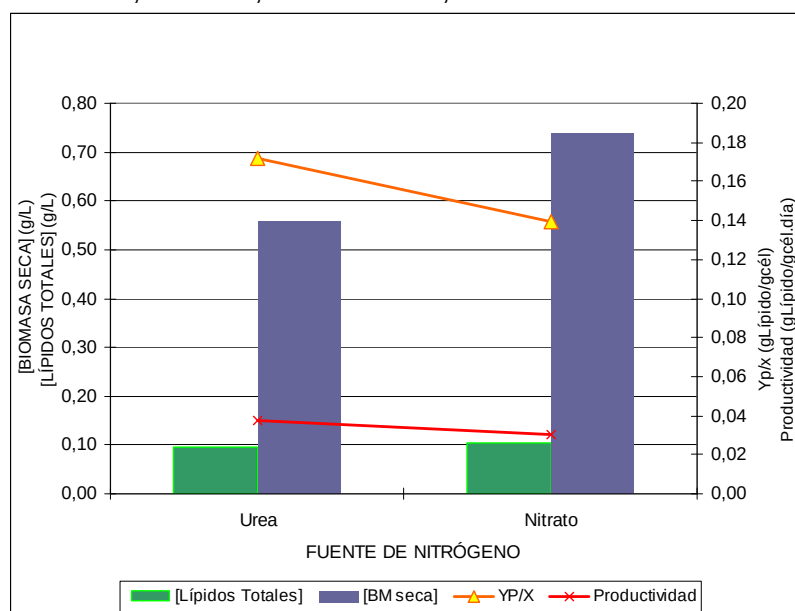
Evaluaciones sobre el efecto de la fuente de nitrógeno (nitrato, nitrito, amonio y urea) en varias cepas de microalgas reportan que las mayores producciones de biomasa, estimada bien como células o bien como biomasa seca por volumen de cultivo, se obtienen en los cultivos con nitrato (Fidalgo *et al.*, 1994 op. cit.). La urea además de estimular el crecimiento celular es un compuesto caotrópico y seleccionador de microorganismos, ya que no todos los microorganismos poseen el mecanismo enzimático necesario para crecer a expensas del compuesto (Hessen, 1993). En la tabla 9 se presentan los parámetros cinéticos calculados para las fermentaciones.

Tabla 9. Parámetros cinéticos obtenidos en la evaluación de urea y Nitrato como fuentes de nitrógeno con la cepa de *Chlorella* Ch4 a 7 días de crecimiento en columnas aireadas de 12 litros.

Fuente Nitrógeno	Tiempo (días)	Prod. celular neta (gcél/L)	Prod. Lípidos neta (gLíp/L)	μ_{max} (día ⁻¹)	t_g (días)	Q_x (gcél/L. día)	Q_p (gLíp/L. día)	$Y_{P/X}$ (gLíp/gcél)	q_p (gLíp/gcél l.día)	Contenido Lípidos (%cél)
Urea	7	0,5582	0,0961	0,8562	0,8095	0,0821	0,0141	0,1722	0,0253	17,22
Nitrato	7	0,7389	0,1030	0,9343	0,7419	0,1087	0,0151	0,1393	0,0205	13,93

En la figura 27 se presenta un comparativo entre los parámetros cinéticos asociados a Biomasa y Lípidos para la cepa de *Chlorella* sp Ch4 en nitrato y urea como fuentes de nitrógeno.

Figura 27. Comparativo de parámetros cinéticos (Biomasa y lípidos) de *Chlorella* sp Ch4 con dos fuentes de nitrógeno (urea y nitrato). Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz con stante entre 2000 y 4000 lux.



Con base en las productividades volumétricas (Q_x) (Q_p) y específica (q_p), así como en el rendimiento de biomasa en lípidos ($Y_{p/x}$), se determinó que tanto el nitrato como la urea favorecían notablemente el crecimiento y la producción de lípidos ($P < 0,05$) con el microalga *Chlorella* sp Ch4 en las condiciones de cultivo aplicadas.

4.4.4 Evaluación de la relación Nitrógeno: Fósforo y su influencia en el crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella* sp Ch4. Se estudió el efecto de la relación N:P del medio de cultivo sobre las cinéticas de crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella* sp Ch4 a nivel de columnas aireadas de 12 litros durante 7 días de cultivo.

De acuerdo con 3.3.3.4 se evaluaron cuatro relaciones N:P: 10:1, 30:1, 50:1 y 80:1 utilizando nitrato y fosfato diácido de potasio con el propósito de establecer el potencial de la cepa y su capacidad de crecimiento y producción de lípidos bajo condiciones de eutroficación y la factibilidad de su posible escalado en aguas residuales industriales. Se tuvo como control el medio Bristol con relación N:P 1:1.

Las relaciones N:P seleccionadas para el estudio responden a condiciones frecuentes en sistemas acuáticos lénticos intervenidos por la actividad humana, como consecuencia de liberación de contaminantes y/o materia orgánica de sistemas de alcantarillado. Esto es, ambientes eutroficados donde la cantidad relativa de nitrógeno a fósforo disponible en el agua ($>80:1$) ejerce una influencia positiva sobre el tipo y crecimiento de organismos y en particular de las microalgas. Como consecuencia de la alta concentración de estos nutrientes en el agua, se presenta gran proliferación celular de organismos fotosintéticos y organolitotrofos (buchón de agua o jacinto, manglares, algas diatomáceas, cianofíceas y clorofíceas, entre otros) que consumen activamente al oxígeno del cuerpo de agua léntico generando empobrecimiento de la diversidad del sistema y selección de organismos sensibles. Estos sistemas por depender de las

condiciones estacionales de invierno:verano para la recuperación de nutrientes y oxigenación son altamente propensos a la eutroficación. Algunos ejemplos de sistemas afectados por esta condición son la Ciénaga Miramar (Barrancabermeja) y la Ciénaga Grande de Santa Marta (Informes de Monitoreos de Impacto Ambiental en cuerpos de agua en áreas operativas con influencia de ECOPETROL, 2005-2008).

La evidencia sugiere que la composición y estructura de la comunidad fitoplanctónica está relacionada con la disponibilidad de fósforo y de nitrógeno, y además contribuye a la aparición de nuevas especies fitoplanctónicas. (Aguirre, 2006, González, 1998). La abundancia de las clorofíceas y en particular de géneros como *Scenedesmus* y *Chlorella* ante procesos de eutroficación es una de las respuestas iniciales de la comunidad del fitoplancton ante los cambios en la composición del cuerpo de agua por enriquecimiento con nutrientes generalmente asociados a relaciones nitrógeno:fósforo entre 30-50:1 y superiores (Sommer, 1983, Sommer, 1988; FAO, 2005 op. cit.).

En las figuras 28 a 32 se presentan las cinéticas de crecimiento y de producción de lípidos y el comportamiento del pH para cada una de las relaciones evaluadas y la cinética control con medio Bristol cuya relación N:P es de 1:1.

Figura 28. Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de *Chlorella* sp Ch4 en Medio Bristol con relación N:P 10:1. Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.

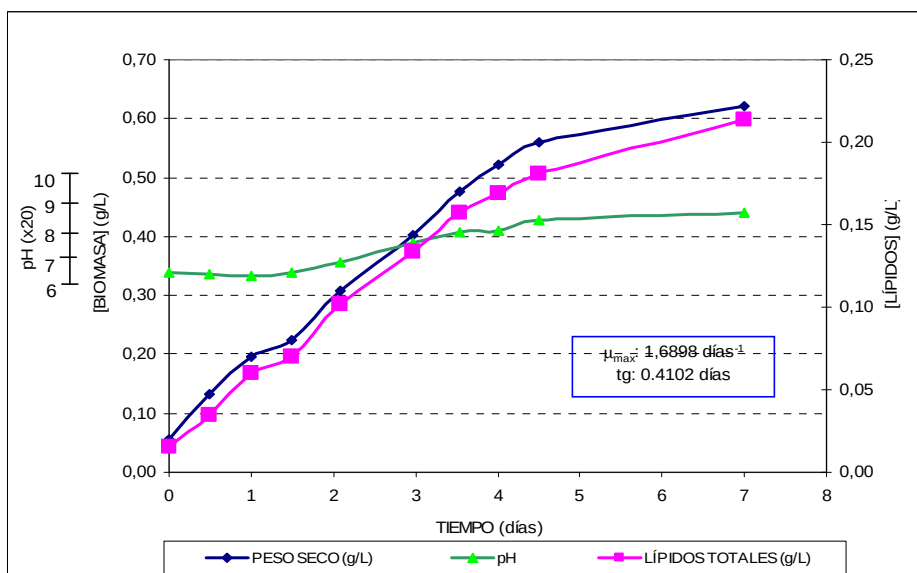


Figura 29. Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de *Chlorella* sp Ch4 en Medio Bristol con relación N:P 30:1 Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.

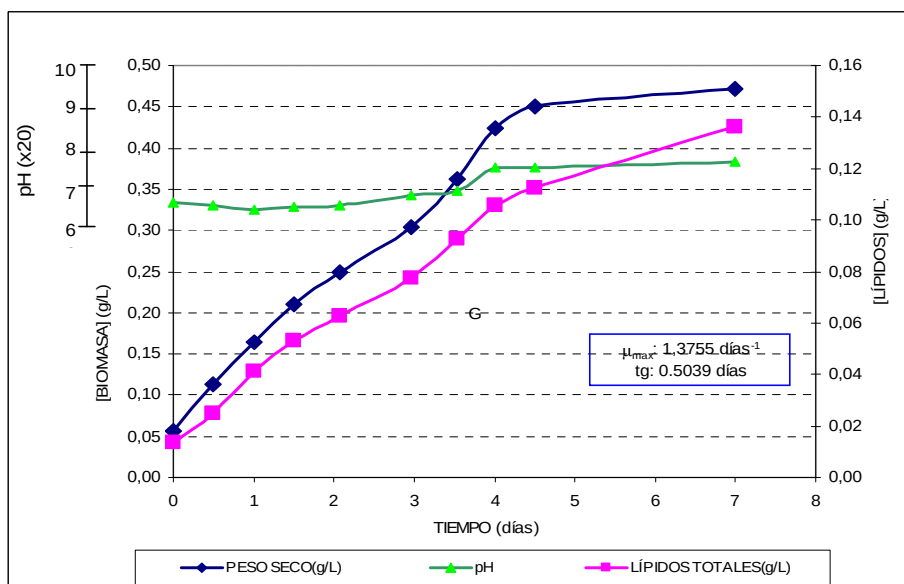


Figura 30. Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de *Chlorella* sp Ch4 en Medio Bristol con relación N:P 50:1 Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.

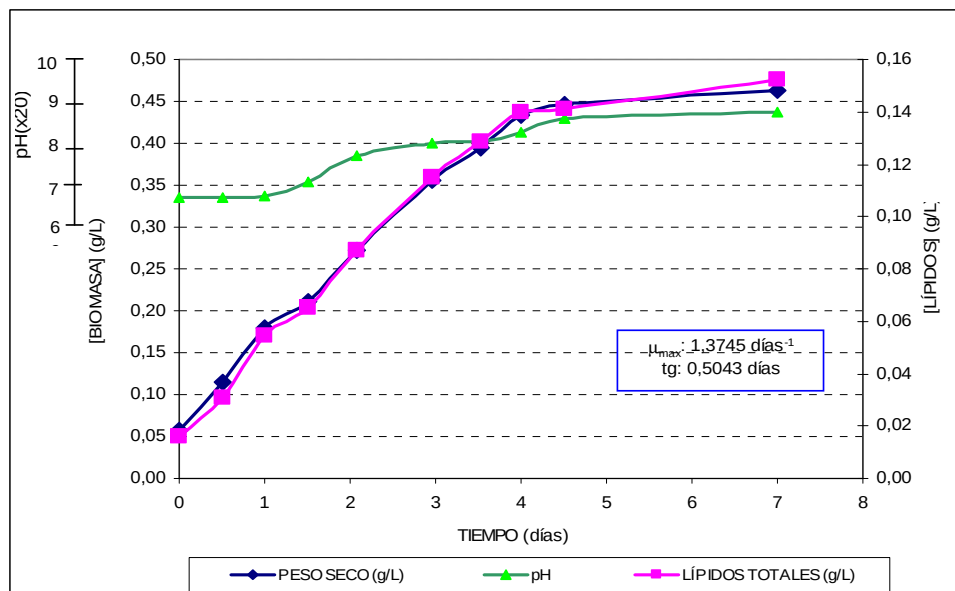


Figura 31. Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de *Chlorella* sp Ch4 en Medio Bristol con relación N:P 80:1. Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.

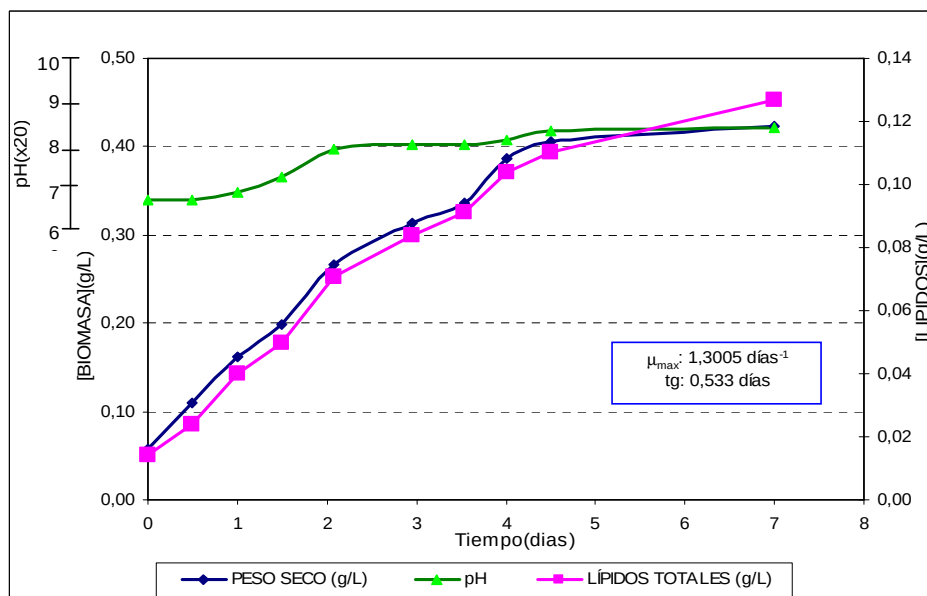
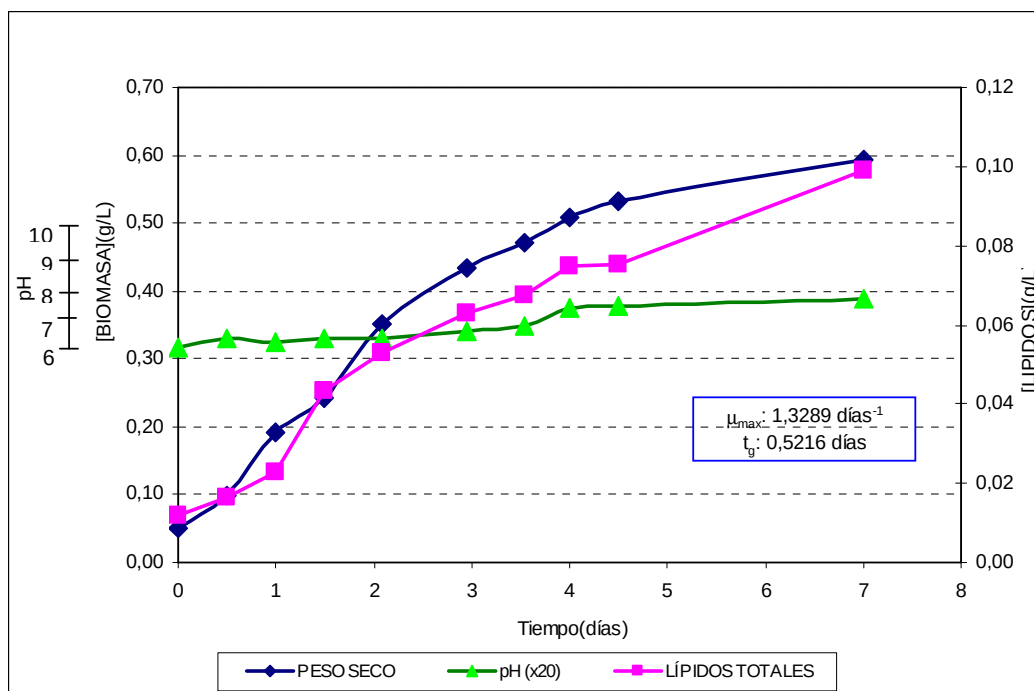


Figura 32. Biomasa y Producción de Lípidos totales del Control de *Chlorella* sp Ch4 en Medio Bristol Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2 000 y 4000 lux.



La mayor velocidad específica de crecimiento para *Chlorella* spCh4 fue de 1,6898 días⁻¹ en el medio con relación 10:1 y disminuyó hasta llegar a la relación 80:1 con un valor de 1,3005 días⁻¹. Se observa que a medida que aumenta la relación N:P, la velocidad específica de crecimiento disminuye y el tiempo de generación de la cepa se hace mayor. En este caso, los valores estuvieron entre 0,4102 días para la relación N:P 10:1 y 0,5330 días para la relación N:P 80:1, lo que indica que las relaciones altas de nutrientes tienen efectos directos sobre el crecimiento de la microalga *Chlorella* sp Ch4, información que ha sido ampliamente publicada (Illman *et al.*, 2000 op. cit.; Liu *et al.*, 2007 op. cit.; Rodolfi *et al.* 2007 op. cit.).

No se evidenció fase de adaptación (lag) para ninguna cinéticas. Sin embargo, es importante analizar el comportamiento del crecimiento celular ya que algunas gráficas evidencian un posible comportamiento diáuxico en las relaciones N:P

evaluadas. Considerando que se trata de inóculos que provienen de medio Bristol con relación N:P 1:1 es factible que al inocularse al medio de cultivo con relaciones N:P altas la microalga continúe su crecimiento durante los primeros dos días pero que algún sector del cultivo sufra un efecto de inhibición mediado por la alta carga de nitrógeno que disminuye la masa celular total, efecto que desaparece una vez surgen los mecanismos adaptativos propios de la célula (que proviene de un medio ambiente altamente eutroficado) y se multiplican clones capaces de sobrevivir bajo éstas condiciones, lo que se aprecia como una segunda fase de crecimiento exponencial del cultivo. Este comportamiento ha sido observado con *C. vulgaris* en medios con concentraciones de nitrógeno correspondientes al 200% comparadas con el control, en los que luego del quinto día de cultivo, la cepa presenta una mayor velocidad de crecimiento, lo que indica que probablemente se empieza a renovar. (Aguirre, 2007).

En la tabla 10 se presentan los parámetros cinéticos calculados para las fermentaciones.

Tabla 10, Parámetros cinéticos obtenidos en la evaluación en medio Bristol de cuatro relaciones N:P con la cepa de *Chlorella* Ch4. Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25±2 °C, aire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.

Relación N:P	Tiempo (días)	Prod celular Neta (gcél/L)	Prod Lípidos neta (gLip/L)	μ_{max} (día ⁻¹)	t_g (días)	Q_x (gcél/L.día)	Q_p (gLip/L.día)	$Y_{P/X}$ (gLip/gcél)	q_p (gLip/gcél.día)	Producción (Líp %)
10:1	7	0,5642	0,1984	1,6898	0,4102	0,0806	0,0283	0,3516	0,0502	35,16
30:1	7	0,4142	0,1229	1,3755	0,5039	0,0592	0,0176	0,2967	0,0424	29,67
50:1	7	0,4047	0,1204	1,3745	0,5043	0,0578	0,0172	0,2975	0,0425	29,75
80:1	7	0,3658	0,1126	1,3005	0,5330	0,0523	0,0161	0,3078	0,0440	30,78
Control Bristol	7	0,5431	0,0872	1,3289	0,5216	0,0776	0,0125	0,1606	0,0229	16,06

Chlorella sp Ch4 muestra la mayor productividad celular volumétrica (Q_x) con 0,0806 g cél/L.día para la relación N:P 10:1 y en orden descendente para el

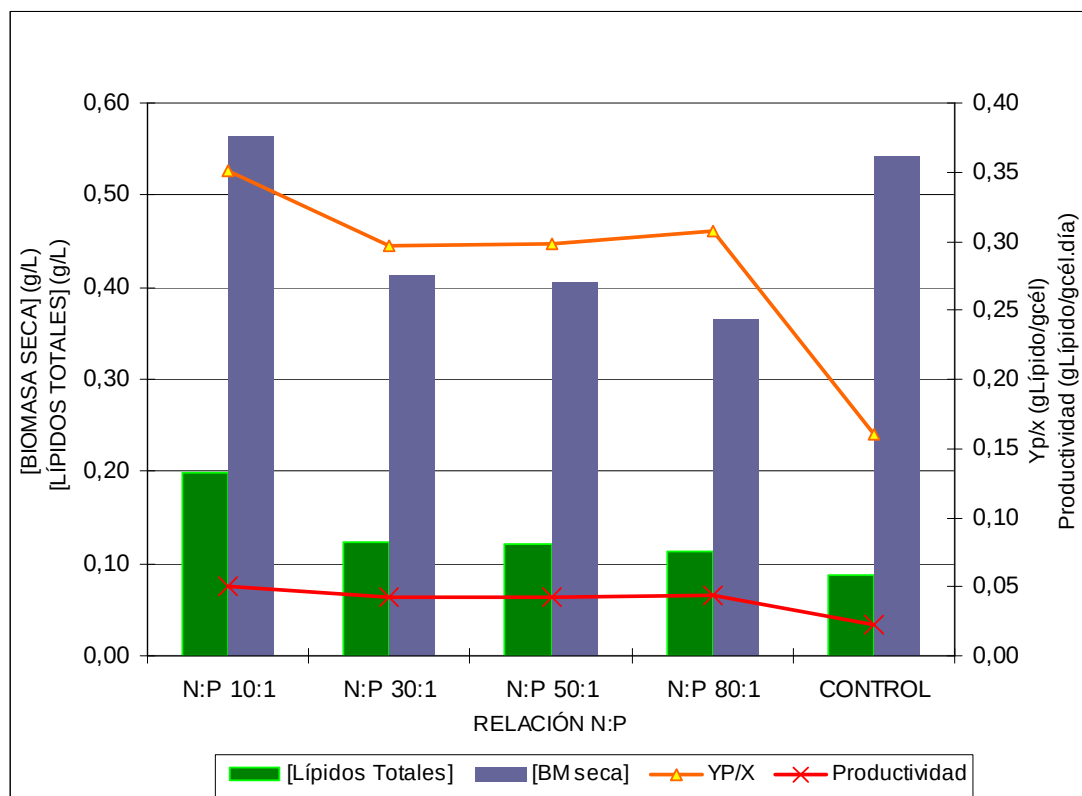
control y las relaciones 30:1, 50:1 y 80:1 respectivamente. La producción celular más alta fue de 0,5642 gcél/L para la cepa en medio con relación N:P 10:1 seguida en orden descendente por el control y las relaciones 30:1, 50:1 y 80:1.

El aumento de la concentración de nitrógeno tuvo incidencia sobre el crecimiento poblacional de *Chlorella* sp Ch4 (Figura 36), indicando que a mayor concentración de nitrógeno se presentaba una menor producción celular. La relación N:P 10:1 tuvo un crecimiento poblacional cercano al de la cinética control y mayor al de las otras relaciones N:P consideradas, por lo que se puede concluir que hay cierta limitación del crecimiento de *Chlorella* sp Ch4 al aumentar la proporción de nitrógeno con respecto al fósforo.

En cuanto a la incidencia sobre la producción de lípidos, para la cinética en relación 10:1, se obtuvo la más alta productividad volumétrica (Q_p) con 0,0283 gLíp/L.día, el mejor rendimiento de biomasa en lípidos ($Y_{p/x}$) con 0,3516 gLíp/gcél y la más alta producción de lípidos con un 35,16%. Para las relaciones N:P 30:1, 50:1 y 80:1 los valores de productividades en biomasa y lípidos, rendimiento de biomasa en lípidos y producción de lípidos fueron similares sin diferencias significativas ($P < 0,05$) entre sí. Se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) para la producción de lípidos por *Chlorella* sp entre las cinéticas con relaciones N:P 10:1, 30:1, 50:1 y 80:1 y la cinética control en medio Bristol N:P 1:1,

En la figura 33 se presenta un comparativo entre los parámetros cinéticos asociados a Biomasa y Lípidos para la cepa de *Chlorella* sp Ch4 en diferentes relaciones N:P.

Figura 33. Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de *Chlorella* sp Ch4 evaluadas en Medio Bristol para cuatro relaciones N:P evaluadas. Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 12L con 8 l de medio, 25 ± 2 °C, a ire a 1 vvm, luz constante entre 2000 y 4000 lux.



Chlorella sp Ch4 presentó la mayor productividad específica (q_p) para la relación N:P 10:1 con 0,0502 gLíp/gcél.día y la mejor producción de lípidos con 35,16% para 7 días de cultivo. Con base en los parámetros cinéticos y la estadística se concluye que la relación N:P 1:10 favorece tanto el crecimiento como la producción de lípidos de *Chlorella* sp Ch4.

4.4.5. Estudio del efecto de agua residual en la cinética de crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella* sp Ch4. Se estudió el comportamiento cinético de *Chlorella* sp Ch4 en medio Bristol suplementado al 10% V/V con agua de PTAR de la Refinería de Barrancabermeja en columna de acrílico con fondo

cónico de 250 litros de capacidad durante 12 días de cultivo. La cinética control se realizó en iguales condiciones con medio Bristol sin adición de agua PTAR, según lo definido en 3.3.3.5.

Este estudio se realizó para evaluar la factibilidad de utilizar el agua residual de PTAR como fuente de nutrientes para el crecimiento de *Chlorella* sp Ch4 y su posible acumulación de lípidos transformables en biocombustibles. En el cultivo de microalgas, se utilizan diferentes medios de cultivo entre los que se incluyen el medio Bristol (Starr & Zeikus, 1993) y el medio algal (Fábregas et al. 1985) entre otros. El análisis fisicoquímico del agua de PTAR (tabla 9) mostró que nutricionalmente es muy similar a estos medios de cultivo, por lo que surge como opción para producir biomasa de microalgas (fuente de lípidos). Adicionalmente, en caso de llevarse el proceso a un nivel industrial, habría suministro de CO₂ disponible en la refinería de Barrancabermeja con lo que se aumentaría la factibilidad económica de producción de microalgas a gran escala y habría un valor agregado asociado a la depuración de esta agua, un tratamiento biológico terciario.

Se utilizó agua PTAR en razón a su alta carga orgánica y su disponibilidad de uso. El control con medio Bristol permitió evaluar la integridad del inóculo en condiciones óptimas de crecimiento y el analizar el efecto del agua de PTAR sobre el crecimiento y producción de lípidos por *Chlorella* sp Ch4.

En las figuras 34 y 35 se presentan la cinética de crecimiento y producción de lípidos para *Chlorella* sp Ch4 en agua PTAR al 10%.

Figura 34. Cinética de Producción de Biomasa y Lípidos totales de *Chlorella* sp Ch4 en Agua PTAR al 10% Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 250L conteniendo 200 L de medio, 25±2 °C, aireación a 20 psi, luz constante entre 4000 y 5000 lux.

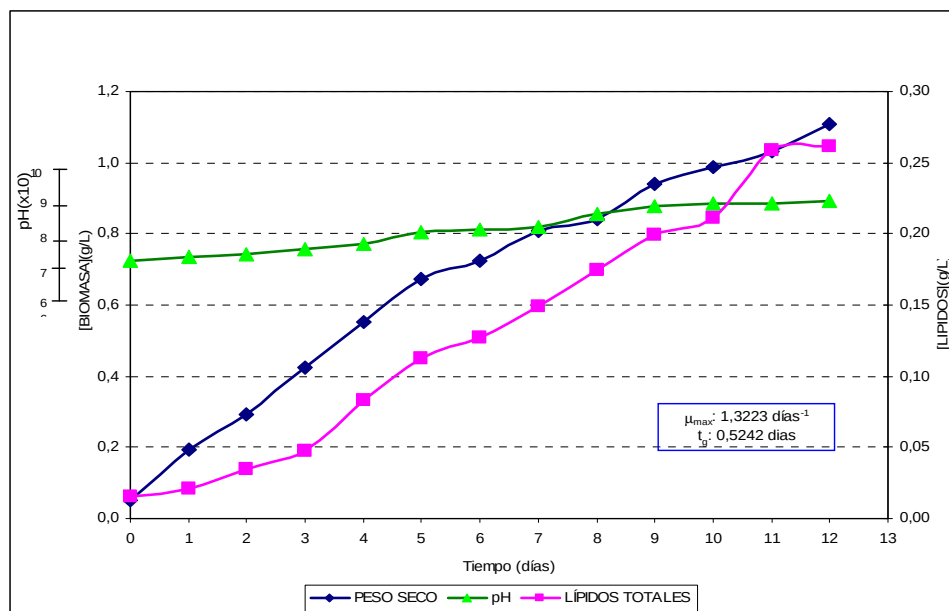
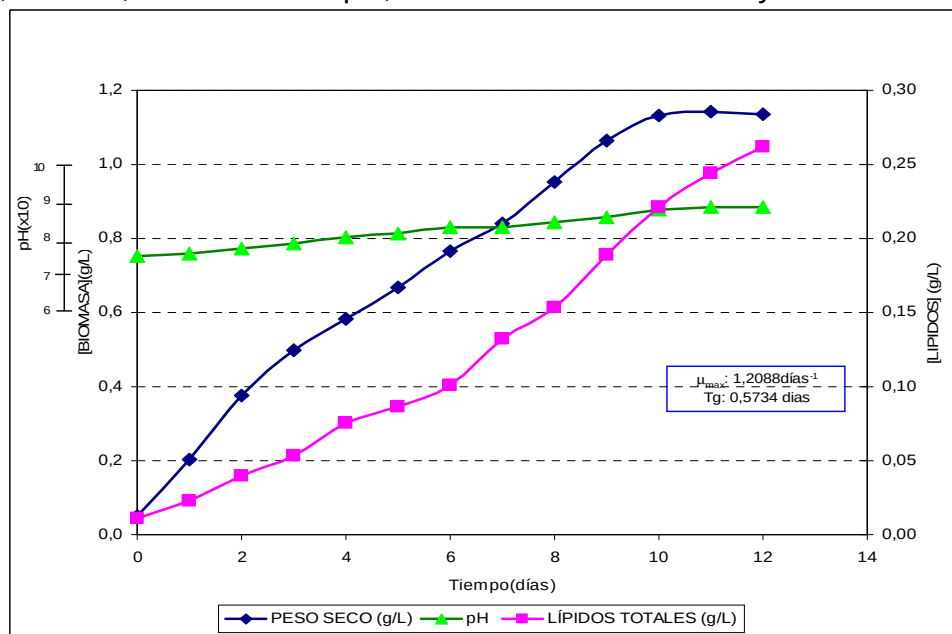


Figura 35. Biomasa y Producción de Lípidos totales de *Chlorella* sp Ch4 en medio Bristol Experiencia con *Chlorella* sp Ch4, columna de 250L conteniendo 200 L de medio, 25±2 °C, aireación a 20 psi, luz constante entre 4000 y 5000 lux.



En la evaluación del medio que contiene agua PTAR al 10% V/V la velocidad específica máxima de crecimiento para *Chlorella* sp Ch4 fue de $1,3223 \text{ días}^{-1}$, mientras que en la cinética control se obtuvo una velocidad específica máxima de crecimiento de $1,3765 \text{ días}^{-1}$. Son velocidades altas considerando que se han reportado cepas de *Chlorella* que crecen en medios con suplemento nutricional proteico en concentraciones superiores al 10% para producción alimentaria, que alcanzan velocidades máximas de crecimiento de $0,17$ a $0,29 \text{ días}^{-1}$ (Rosales *et al.*, 2007) y cepas de *Chlorella* evaluadas para la remoción del nitrato en aguas subterráneas contaminadas con velocidades específicas máximas de crecimiento de $0,08 \text{ días}^{-1}$ en medio BG-11 (Qu, 2004).

Los tiempos de generación fueron $0,5036$ días para la cinética con agua PTAR al 10% y $0,5242$ días para el control, que indican que no hubo inhibición de la cepa en presencia del agua PTAR adicionada al medio de cultivo.

No se evidenció fase de adaptación (lag) para ninguna cinética evaluada ya que los preinóculos e inóculos para este ensayo se realizaron en medio Bristol con agua PTAR al 10% y en medio Bristol para la cinética control. Las células en la cinética control se mantuvieron en fase exponencial hasta el décimo día de cultivo, en la cinética con agua de PTAR al 10% la fase exponencial se prolonga durante toda la prueba.

Se obtuvieron producciones celulares de $1,0588 \text{ gcél/L}$ en medio Bristol con agua PTAR al 10% y de $1,0152 \text{ gcél/L}$, sin presentarse diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los dos medios de cultivo. Estos resultados refuerzan el potencial de la cepa nativa para su crecimiento y acumulación de lípidos ante condiciones de suficiencia de nitrógeno ya que como se puede observar en la tabla 11 las aguas de PTAR son principalmente ricas en macronutrientes como nitrógeno y fósforo y mantienen relaciones N:P aproximadas de 1800:1. Por tal razón, preliminarmente se hicieron corridas de prueba en las que se evaluó la capacidad

de carga de agua PTAR que podía soportar la cepa, de manera tal que su crecimiento y producción de lípidos no se viera inhibida por una carga orgánica demasiado alta.

Los resultados obtenidos muestran una mayor producción de biomasa que los experimentos en columnas de 12 litros, utilizando el mismo medio Bristol, hecho relacionado con las condiciones de crecimiento en el reactor que incluyen suministro de aireación, luz y control de temperatura. Los resultados obtenidos son muy importantes ya que la cepa está creciendo en concentraciones muy altas de nutrientes. Lo anterior con base en el análisis de las cinéticas obtenidas y el hecho de que *Chlorella* sp Ch4 mantenga un crecimiento permanente y una producción sostenida de lípidos en el medio que contiene agua PTAR al 10% y a que no se observa inhibición por la alta carga orgánica. Con los datos disponibles no es posible hacer otro tipo de inferencias ya que no se realizó una cinética de consumo de nitrógeno y por lo tanto no se puede establecer si la célula desvía su metabolismo hacia el almacenamiento de lípidos una vez consume toda la fuente nitrogenada. Sin embargo, con base en los resultados y la información publicada para estos fenómenos, es posible sospechar que siendo una cepa nativa tenga una tasa de consumo de nitrógeno muy alta, lo cual deberá corroborarse con estudios posteriores.

Las microalgas que se aíslan de las aguas residuales se caracterizan por soportar elevadas concentraciones de nutrientes, los cuales son útiles para el desarrollo y crecimiento poblacional. De esta manera, los microorganismos presentan ciertos mecanismos de adaptación para poder sobrevivir en estos medios. Las microalgas presentan además, actividad metabólica elevada, capacidad de resistir variaciones ambientales y un mayor desarrollo de cultivo en fase exponencial con la finalidad de tolerar las altas concentraciones de nutrientes inorgánicos. Por este motivo, se han utilizado históricamente para remover nitrógeno, fósforo, DQO de las aguas residuales (Chacón et al., 2004 op. cit.). Algunas microalgas como *Chlorella* tienen

la capacidad de crecer en medios altamente selectivos, lo que significa que pueden crecer en piscinas abiertas y mantenerse libre de contaminantes como otras algas y protozoos. Esto se debe a que *Chlorella* crece bien en medios ricos en nitrógeno y fósforo (Borowitzka, 1999).

En la tabla 11 se presentan los parámetros cinéticos calculados para las dos fermentaciones.

Tabla 11. Parámetros cinéticos con la cepa de *Chlorella* Ch4 en medio Bristol con agua PTAR al 10% V/V y medio Bristol. Experiencias con *Chlorella* sp Ch4, Reactor cónico de 250L con 200 L de medio, 25±2 °C, aireación a 20 psi, luz constante entre 4000 y 5000 lux

Condición Evaluada	Tiempo (días)	Prod. celular neta (gcél/L)	Prod. Lípidos neta (gLip/L)	μ_{max} (día ⁻¹)	t_g (días)	Q_x (gcél/L. día)	Q_p (gLip/L.día)	$Y_{p/x}$ (gLip/gcél)	q_p (gLip/gc él.día)	Producción (Lip %)
Bristol +										
PTAR 10%	12	1,0588	0,2467	1,3223	0,5242	0,0882	0,0206	0,2330	0,0194	23,30
Control										
Bristol	7	0,9499	0,1960	1,2088	0,5734	0,1357	0,0280	0,2063	0,0295	20,63

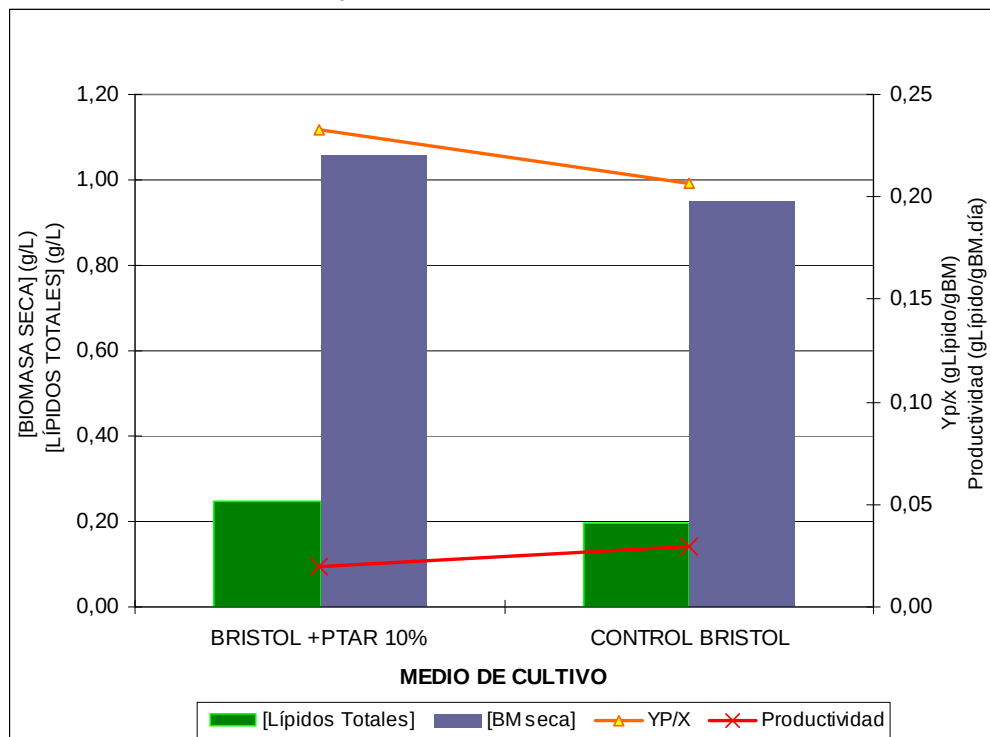
La productividad celular volumétrica (Q_x) indica que la cepa *Chlorella* spCh4 en medio Bristol con agua PTAR al 10% produjo 0,0882 g cél/L.día y 0,01357 g cél/L.día en la cinética control. Estos son valores similares a los obtenidos en otros estudios en los que se han reportado productividades de 0,0393 g cél/L.día en medios de cultivo preparados con diluciones del 30% de aguas residuales en cultivo semicontinuo (Voltolina *et al.*, 2005) y en sistemas similares con dilución del agua residual al 10% con productividades de 0,1537 g cél/L/d. (Nuñez *et al.*, 2001)

Con base en las productividades volumétricas (Q_x) (Q_p) y específica (q_p), así como en el rendimiento de biomasa en lípidos ($Y_{p/x}$), se determinó, que el agua PTAR adicionada al 10% en medio Bristol favorecía el crecimiento y la producción

de lípidos con la microalga *Chlorella* sp Ch4 y en las condiciones de cultivo evaluadas.

En la figura 36 se presenta un comparativo de parámetros cinéticos con *Chlorella* sp Ch4 obtenidos en las cinéticas .a 200 litros en medio Bristol con y sin adición de agua PTAR

Figura 36. Comparativo de parámetros cinéticos entre los medios Bristol con PTAR al 10% V/V para la cepa de *Chlorella* sp y Medio Bristol Experiencias con *Chlorella* sp Ch4, columna de 250L con 200 L de medio, 25±2 °C , aireación a 20 psi, luz constante entre 4000 y 5000 lux.



Los resultados de productividades y rendimiento en biomasa y lípidos se asocian al potencial de la cepa ya que siendo un organismo nativo aislado de un cuerpo de agua altamente eutroficado (Ciénaga Los Patos- Cicuco) está preparado para crecer y predominar en ambientes con alta carga orgánica. Adicionalmente, se asocian al efecto de escala y configuración de los reactores empleados y a los

sistemas homogéneamente aireados, con adecuado sistema de sello para evitar la pérdida por evaporación y facilidades para salida de oxígeno.

En relación con el diseño del reactor utilizado para este estudio, se contempló que tuviera un sistema de inyección de aire tipo *airlift*, luces dispuestas centralmente y forma cónica para facilitar la decantación de la biomasa entre otras consideraciones. Se ha publicado extensamente en cuanto a fotobioreactores para producción de microalgas y las especificaciones particulares y generales de diseño más importantes (Mazzuca *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2003; de Moraes, 2007; Sánchez *et al.*, 2002 ; Rodolfi *et al.*, 2009 op. cit.).

Considerando lo anterior, el efecto del suministro adecuado de aire es fundamental ya que contiene la fuente de carbono en forma de CO₂ garantizando la homogeneidad del medio. Se ha reportado que la homogenización, mediante la aireación, asegura la distribución homogénea de las células y los nutrientes de la suspensión del cultivo, lo cual evita la formación de gradientes minerales alrededor de las mismas durante los períodos de metabolismo activo y mejora la distribución de la luz hacia las células de modo que cada una esté expuesta a la misma intensidad de radiación. Además, la agitación impide los efectos inhibitorios que se producirían en un cultivo no agitado sobre la población continuamente expuesta a la radiación y por lo tanto incidir en el crecimiento celular (Fidalgo, 1992 op. cit.).

Las microalgas tienen el potencial para remover nitrato y fosfato de las aguas residuales o de suelos fertilizados con fertilizantes inorgánicos en los que éstos se convierten en importantes contaminantes. Las algas juegan un papel importante en tratamiento de aguas residuales en piscinas y otros sistemas (Chisti, 2006)

Un análisis de la caracterización fisicoquímica del agua PTAR antes crecimiento del microalga *Chlorella* sp Ch4 indica que la relación N:P al inicio de la evaluación es 240:1 aproximadamente. Los nitratos estuvieron por debajo del valor mínimo

cuantificable (0,63mg/L), y el resultado de nitrógeno kjeldal muestra casi 100 mg de nitrógeno orgánico, por lo que se puede presumir que el nitrógeno asimilable por las microalgas es en gran parte el amoniacal. En cuanto al cloro, en el agua de PTAR es exactamente igual a la del medio Bristol, pero al hacer la dilución del agua el cloro se reduce 10 veces. (0,03g/L, después de la dilución 0,003g/L). El sulfato está aumentado 10 veces en el agua de PTAR diluida (10%) con respecto del Bristol, con respecto al PO₄, en el medio Bristol hay 150mg/L, mientras que en la dilución de PTAR hay 0,03mg/L (5000 veces menos), el Fe se encuentra en la misma cantidad tanto en el agua de PTAR diluida como en el medio Bristol (0,2mg/L).

Luego del crecimiento de las microalgas en el medio con agua PTAR al 10% se determinó que el nitrógeno amoniacal había sido consumido durante los 12 días de cultivo, lo mismo que el fósforo. Hubo un aumento de la concentración de nitratos asociado muy probablemente debido a la presencia de bacterias en esta agua industrial. La concentración inicial de fenoles que era 31 mg/L (medio Bristol conteniendo agua PTAR al 10%), luego de los 12 días de cultivo se era una cantidad mínima cuantificable por el método (0,029 mg/L).

El calcio se redujo en un 65%, el manganeso se redujo en más de un 80%, el magnesio en un 20%. El sodio y el potasio se redujeron en un 83 y 54% respectivamente.

Tabla 12. Resultados del análisis fisicoquímico del agua de PTAR antes y después del crecimiento de *Chlorella sp Ch4* durante 14 días. Se incluyen los valores de Decreto 1594-1984 para aguas de vertimiento.

METODO	UNIDAD	ANTES CULTIVO <i>Chlorella</i>	DESPUES CULTIVO <i>Chlorella</i>	DECRETO 1594- 1984 Art 38
ALCALINIDAD TOTAL EN AGUAS CLORUROS EN AGUAS POR POTENCIOMETRIA	mg CaCO3/L mg Cl-/L	190 32,5	0,81 8,16	250
CONDUCTIVIDAD EN AGUAS	micromhos/cm	2170/21,6	285/23.0	
DQO-DEMANDA QUIMICA DE O2	mg O2/L	853	-----	
FENOLES EN AGUAS	mg/L	31,8	<0,029	0,002
FOSFORO DISUELTO EN AGUAS	mg P/L	0,088	<0,020	
FOSFORO DISUELTO EN AGUAS	mg PO4-3/L	0,27	<0,020	
GRASAS-ACEITES EN AGUAS GRAVIMET. A-5520	mg/L	73,9	<1,07	
NITRATOS EN AGUAS (FOTOMETRICO)	mg NO3/L	<0,63	3,07	10
NITRITOS EN AGUAS (FOTOMETRICO)	mg NO2/L	0,033	0,091	10
NITROGENO AMONiacal EN AGUAS/POTENCIOME.	mg NH3/L	65,8	<0,59	
NITROGENO TOTAL KJELDAHL EN AGUAS	mg/L	160	-----	
SOLIDOS DISUELTOS EN AGUAS	mg/L	879	176	
SOLIDOS SEDIMENTABLES EN AGUAS	ml/L	0,2	<0,10	
SOLIDOS SUSPENDIDOS EN AGUAS MEMB	mg/L	67,2	0,2	
SOLIDOS SUSPENDIDOS VOLATILES Y FIJOS	mg/L	52,4	<0,1	
SOLIDOS TOTALES EN AGUAS	mg/L	977	181	
SULFATO EN AGUA POR TURBIDIMETRIA	mg SO4=/L	7600	86,5	400
CALCIO	mg/l	38,62	12,976	
CADMIO POR ICP-MS	microg/L	3,44	<0,808	0,01
COBRE POR ICP-MS	microg/L	19,61	<1,382	0,2
NIQUEL POR ICP-MS	microg/L	17,74	6,549	0,2
VANADIO POR ICP-MS	microg/L	11,99	3,1305	
MANGANESO POR ICP-MS	microg/L	109,94	21,2	0,2
MAGNESIO POR ICP-MS	mg/L	3,389	2,7515	
HIERRO POR ICP-MS	mg/L	2,133	137,32	5.0
ZINC POR ICP-MS	microg/L	187,1	140,66	2.0
SODIO POR ICP-MS	mg/L	131,7	21,994	
POTASIO POR ICP-MS	mg/L	3,635	1,7245	
COBALTO POR ICP-MS	microg/L	4,826	<0,372	0,05
MOLIBDENO POR ICP-MS	microg/L	8,625	<1,421	0,01
SILICIO POR ICP-MS	mg/L	5,421	8,505	

Fuente: Laboratorios de Aguas y Suelos y espectroscopía ECOPETROL ICP.

Los resultados obtenidos son importantes ya que además de producirse una cantidad considerable de biomasa en la cinética en medio Bristol con agua PTAR al 10% en un fotoreactor de 200 litros con una cepa de *Chlorella* nativa que acumula lípidos en porcentaje mayor al 20%, lo que la hace promisoría para la producción de biocombustibles, es evidente con los resultados finales el valor agregado que se obtiene al depurar los componentes del agua PTAR, entre otros, el fenol uno de sus principales contaminantes.

5. CONCLUSIONES

Se aislaron siete cepas de *Chlorella* sp a partir de muestras de ciénagas eutrofizadas ubicadas en la cuenca baja y media del Río Magdalena, mediante la técnica de subcultivo, utilizando medio Bristol.

Se estandarizaron procedimientos para mantenimiento y conservación de las microalgas estudiadas. En el caso de los preinóculos para cinéticas de crecimiento de biomasa y producción de lípidos se logró disminuir, y en algunos casos eliminar, la fase de adaptación (fase lag), lo cual representa una enorme ventaja para los procesos escalados a nivel industrial.

La cepa *Chlorella* sp Ch4, presentó los mejores parámetros cinéticos en medio Bristol, utilizando una columna de 2L, durante 11 días de cultivo. Los principales valores obtenidos fueron los siguientes: Velocidad específica de crecimiento (μ) 0,9082 h⁻¹; tiempo de generación (t_g) 0,932 días; Productividad específica (q_p) 0,0210 gLíp/g cél.día y un máximo contenido de lípidos del 18,88 %.

En el estudio comparativo de medios de cultivo en columna aireada de 12 L, el medio Bristol presentó los mejores parámetros cinéticos. Los principales valores obtenidos fueron los siguientes: Velocidad específica de crecimiento (μ) 1,2601 h⁻¹; tiempo de generación (t_g) 0,5501 días; Productividad específica (q_p) 0,0199 gLíp/g cél.día y un máximo contenido de lípidos del 12,88 %.

Se estableció que un pH inicial entre 7,5 y 8,5 era el más adecuado para el crecimiento y producción de lípidos por *Chlorella* sp Ch4 utilizando medio Bristol.

En el estudio del efecto de la fuente de nitrógeno, la urea y el nitrato de sodio favorecieron el crecimiento y producción de lípidos a partir de *Chlorella* sp Ch4, presentando valores muy similares en los parámetros cinéticos obtenidos. Sin embargo, la urea es más económica que el nitrato, lo que la hace más apropiada para procesos a escala industrial.

La relación de Nitrógeno: Fósforo 10:1, favoreció notablemente la cinética de crecimiento y producción de *Chlorella* sp Ch4, en comparación con el control (N:P, 1:1). Adicionalmente, se logró demostrar que simulando condiciones de eutroficación (relaciones de N:P hasta 80:1), se lograban resultados parecidos e incluso mejores en comparación con el control. Se resalta la importancia de haber contado con una cepa aislada de ambientes contaminados, en los cuales normalmente son muy altas las concentraciones de nitrógeno.

La cepa seleccionada *Chlorella* sp Ch4 cultivada en reactor de 220 litros no fue inhibida por la presencia de un 10% de agua PTAR, la cual presentaba una alta relación de N:P (240:1). Por el contrario, la cepa creció y produjo lípidos con una concentración del 24%. De esta manera, el agua PTAR constituye una fuente de nutrientes que resulta útil para el crecimiento de microalgas y producción de lípidos en las condiciones experimentales aplicadas, aspecto muy importante para la reutilización de aguas residuales.

Se demostró que la cepa *Chlorella* sp Ch4 seleccionada tiene la capacidad para producir concentraciones de lípidos importantes con potencial para su escalado a nivel industrial en condiciones agresivas de carga orgánica.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abalde, J.A., Cid A., Fidalgo, P., Torres, E. y Herrero, C.(1995). Microalgas: cultivos y Aplicaciones. Laboratorio de Microalgas. Facultad de Ciencias, Universidad de Coruña. 210 pp.
2. Aguirre, N., Palacio, J., Correa, I. y Hernandez, E. (2007). Ensayos de bioestimulación algal con diferentes relaciones nitrógeno:fósforo, bajo condiciones de laboratorio. *Revista ingenierias Universidad de Medellín*, 11:11-21
3. Aguirre, N., Werdingb, B., and Palacio, J. (2006). The nitrogen/phosphorus and the succession of phytoplankton in two lakes located in the alluvial prairie of main river in Germany. *Rev. fac.ing.univ. Antioquia*, 38: 136-145.
4. Arredondo, B. y Voltolina, B. (2007). Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal, CIB, México.97 pp.
5. Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J. and Wijffels, R.H.(2002). Photobiological. hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design,*Int. J. Hyd. Energy*; 27: 1195–1208.
6. Andersen, R.A. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic, California, USA.
7. Andersen, R. A., and Mulkey, T. J. (1983). The occurrence of chlorophylls c1 and c2 in the Chrysophyceae. *J. Phycol.* 19:289–94.
8. Azov, Y.(1982).Effect of pH on Inorganic Carbon Uptake in Algal Cultures *App.Env.Mic*, 43:1300-1306.
9. Banerjee, A., Sharma, R., Christ,i Y. and Banerjee, U.(2002).*Boytrococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemical. *Crit Rev Biotechnol*; 22, 245-279.
10. Baumgarten, E. M., Nagel, R. and Tischnel. (1999). Reduction of the Nitrogen and Carbon Content in a Swine Waste with Algae and Bacteria. *Environm, Geol*; 52:281-284.

11. Becker, E.W. (1994). Cambridge studies in Biotechnology. Vol. 10, Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge: Cambridge University Press. 293 pp.
12. Ben-Amortz, A., Shaish, A. and Avron, M. (1989). Mode of action of the massively accumulated B-carotene of *Dunaliella bardawi* in protecting the alga against damage by excess radiation. *Plant Physiol*; 91:1040-1043.
13. Benemann, J.R., Goebel, R.P., Weissman, J.C. and Augenstein D.C. (1982). Microalgae as a source of Liquid fuels, Final report to the US Department of Energy. 202 pp.
14. Berner, T. (1993). Ultrastructure of Microalgae. CRC Press. Inc Boca Raton, Florida. 314 pp.
15. Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. Journal Biochem. Physiol.* 37:911-917.
16. Bodas, K., Brenning, C., Diller, K. and Brand, J. (1985) Cryopreservation of blue-green and eukaryotic algae in the culture collection at the university of Texas at Austin. *Cryo Lett*; 1:267-274.
17. Boney, A.D. (1989). Phytoplankton. Edward Arnold. London. 118 pp.
18. Boussiba, S., Richmond, A.E (1980). c-Phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*, *Arch. Microbiol*, 125:143-147.
19. Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. Vitamins and Fine Chemical from Microalgae. (1988). En: Borowitzka M.A. & Borowitzka, L.J. Microalgal Biotechnology. Vol. 7, Cambridge University Press, Cambridge. 153-196 pp.
20. Borowitzka, M. (1999)(a). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*. 70:313-321.
21. Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large scale outdoor cultures of *Dunaliella salina*. (1999). En: Stadler t, Mollion J, Verdus MC, Karamanos Y, Morvan H, Christiaen D. Eds. Algal biotechnology. Elsevier Applied Science, Barking; 378-381 pp.
22. Brewer, P.C. and Goldman, J.C. (1976). Alkalinity changes generated by phytoplankton growth. *Limnol. Oceanogr.* 21:108-117.
23. Brodie, J. and Lewis, J. (2007). Unravelling the algae. The past, present and future of algal Systematics. CRC Press Inc. Boca Raton Florida. 414 pp

24. Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Garland, C.D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literatura review. Report 205
25. Chacón, C., Andrade, Ch., Cardenas, C., Carmen, C., Araujo, I., Morales, E. (2004). Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Bol. Centro Invest. Biol.*; 38: 94-108.
26. Chang, E., Yang, S. (2003). Some characteristics of microalgae isolates in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. *Bot Bull Acad Si* .; 44: 43-52
27. Chevalier, P., Proulx, D., Lessard, P., Vincent, W., and de la Noue, J. (2000). Nitrogen and phosphorus removal by high latitude mat-forming cyanobacteria for potential use in tertiary wastewater treatment. *J Appl Phycol*; 12:105-112
28. Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., and Das, K. (2009). Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC1 under elevated levels of CO₂ and Temperature. *Int J Mol Sci*, 10:518-532.
29. Chisti, Y. (2006). Microalgae as sustainable cell factories. *Environ Eng Management J*, 5:261-274
30. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biot Adv*, 25:294-306
31. Cid, A., Abalde, J., Herrero, C. (1992). Crecimiento y composición bioquímica de la microalga marina *Tetraselmis suecica* en cultivos mixotróficos con distintos azúcares y aminoácidos. *Cah. Biol. Mar.* 33:169-178.
32. Cohen, Z. (1986). Products of microalgae. En: Handbook of Microalgal Mass Culture. Richmond, A. (ed.),. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. pp: 421-454
33. Darley, W. (1987). Biología de las algas. Enfoque fisiológico. Ed Limusa México. 236p
34. Day, J.G. (1998). Cryo preservation of microalgae and cyanobacteria. *Cryo-Letters Supplement*, 1:7-14
35. Day, J.G., Watanabe, M.M., Morris, G.J., Fleck, R.A. and McLellan, M.R. (1997). Long- viability of preserved eukaryotic algae. *J Appl Phycol*, 9:121- 127.
36. Day, J.G. and McLellan, M.R. (1995). Conservation and freeze-dying protocols. *Methods in Molecular Biology* 38: Totowa NJ: Humana Press Inc. 79-95 pp

37. Deason, T. R. (1983). Cell wall structure and composition as taxonomic characters in the coccoid Chlorophyceae. *J. Phycol.* 19:248–51.
38. Delwiche, C.F. (1999). Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *American Naturalist*; 154:64–177.
39. Delwiche, C.F. and Palmer, J.D. (1997). The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. *Plant Systematics and Evolution*, 11:53–86.
40. De la Noue, J., De Paw, N. (1988). The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotech. Adv.* 6:725-770,
41. De Morais, M.G., Vieira, J.A. (2007). Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. Cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnol Lett.* 29: 1349-1352.
42. De Morais, M.G., Vieira, J.A. (2007). Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Conversion and Management.* 48; 7:2169-2173.
43. De Paw, N., Verboven, J. and Claus, C. (1983). Large-scale microalgae production for nursery rearing of marine bivalves. *Aquacult. Eng.* 2:27-47
44. Dodge, J.D. (1973). The Fine Structure of the Algal Cells.. Academic Press, NY. 261 pp
45. Dorling, M., McAuley, P., Hodge, H. (1997). Effect of pH on growth and carbon metabolism of maltose-releasing *Chlorella*. *Eur. J. Phycol.*, 32:19-24
46. Ducker, S., Willoughby, L. (1964). Potassium Tellurite as a Bacteriostatic Agent in isolating Algae. *Nature*, 212-210 pp
47. Egan, P.F., and Trainor, F.R. (1989). The role of unicells in the polyformous *Scenedesmus armatus* (Chlorophyceae). *J. phycol.* 25:65-70,
48. Endo, H., Sansawa, H. and Nakajima, K. (1977). Studies on *Chlorella regularis*, heterotrophic fast growing strain II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration. *Plant Cell Physiol*, 18:199-205
49. Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B., Abalde, J., (1985). Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*; 49: 231-244.
50. Fábregas, J., Patiño, M., Arredondo, B., Tobar, J., Otero, A. (1995). Renewal rate and nutrient concentrations as tools to modify productivity and biochemical

composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Appl. Microbio. Technol.*; 44:287-292.

51. Falkowski, P.G. and Raven, J.A.(1997). Aquatic Photosynthesis. Malden, MA;Blackwell Science. 169-182 pp

52. FAO corporate document repository. (2005) Manual on the production and use of live for aquaculture.

53. Fidalgo, P., Lopez-Muñoz, I., Reiriz, S. y Herrero, C. (1992). Incidencia de la fuente de nitrógeno sobre la producción de biomasa y composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos masivos. *Actas III Congr Nac Acuicult*, 651-656 pp

54. Fidalgo, P., Lopez-Muñoz, I., Reiriz, S. y Herrero, C. (1990). La microalga marina *Isochrysis galbana* como potencial fuente de obtención de lípidos: Efecto de la edad del cultivo y fuente de nitrógeno. *Biotech-92*. Santiago de Compostela

55. Fogg, G. and Collyer, D. (1953). The accumulation of lipids by algae, En: *Algal Culture: From Laboratory to Pilot Plant*, Pub. No. 600, Burlew, J.S., Ed., Carnegie Institution, Washington, D.C. 177 pp

56. Fogg, G. E. (1971). Recycling through algae. *Proc. R. Soc. Lond.* [B] 179:201-7.

57. Fried, A., Tietz, A., Ben-Amotz, A., Eichenberger, W. (1982). Lipid composition of the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil*. *Biochim. Biophys. Acta*. 713: 419-426

58. Goldman, J.C. and Carpenter, E.J.(1974). A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth. *Limnol. Oceanogr*, 19:756.

59. Goldman, J.C., Yosset, A., Riley, C.B. and Denneth, M.R. (1981). The effect of pH on intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*, 57:1-13.

60. Gonzalez, E.J. y Ortaz, M.(1998).Efectos del enriquecimiento con N y P sobre la comunidad del fitoplancton en microcosmos de un embalse tropical (La Mariposa, Venezuela). *Rev biol trop*, 46;1:27-34.

61. González, E., Paolini, J. and Infante, A.(1991). Water chemistry, physical features and primary production of phytoplankton in a tropical blackwater reservoir (Embalse de Guri, Venezuela). *Verh Internat Verein Limnol* 24: 1477-1481.

62. González,M.A., Parra,O., Cifuentes,A.S.(1995). Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: Alveal K, Ferrario 1995, Oliveira OC Manual de métodos ficológicos. Universidad de Concepción. Chile, 219-250 pp.
63. Gouveia, L., Oliveira, A. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol*;36:269-274.
64. Grobbelaar, J.,(2004). Algal nutrition, In: Handbook of Microalgal culture:*Biotechnology and applied Phycology*, Richmond A., (Ed), Blackwell, Oxford, 97-115 pp.
65. Guillard,R.R.L.(1973). Division rates. En: Handboook of Phycological Methods. Stein, J.R. (ed.). Cambridge University Press, 289-312 pp.
66. Guillard,R.R.L.(1995)Culture methods.En: Hallegraeff G.M., Anderson, D.M. and Cembella, A.D., eds. Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO, Paris;. 45-62 pp.
67. Gushina,I.A. and Harwood,JL.(2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Re.*, 45:160-186
68. Healey,F.P.(1982).Phosphate En:The Biology of Cyanobacteria, Carr NG, Whitton BA., Eds., Blackwell Scientific, Oxford. 135 pp
69. Hollibaugh,J.T., Seibert,D.L. and Thomas,W.H. (1981). Observations on the survival and germination of resting spores of three *Chaeotoceros* (*Baccillariophyceae*) species.*F. Phycol*, 17: 1-9
70. Horvatic, J,Mihaljevic, M. and Stevic, Filip.(2003). Algal growth potential of *Chlorella kessleri* in comparison with *in situ* microphytoplankton dynamics in the water of the marshes of Lake Sakadas. *Periodicum biologorum*.3; 307-312.
71. Illman,A.M., Scragg,A.H. and Shales,S.W(2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen médium. *Enzyme microb*, 27: 631-635
72. Jonte,L., Gaubeca,C., Cardenas,C., Araujo,I.,Ortega,J. and Morales,E.(2002). Agua residual urbana de un sistema de lagunas de estabilización para el cultivo de la cianobacteria *Synechocystis* sp. Libro de Resúmenes de la LII Convención Annual de la AsoVAC. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela.
73. Kaplan D, Richmond A, Dubinsky Z, Aaronson. Algal Nutrition. En: Handbook of Microalgal mass culture.Richmond A.eds. Press inc, Boca Ratón, Florida. 1995;43-67.

74. Keeling,P.J. (2004) Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *American Journal of Botany*;91:1481–1493.
75. Kessler,E.(1984).A general view on the contribution of chemotaxonomy to the systematic of green algae. Systematics Association, Special vol. 17, Academic Press, London, 391-407 pp.
76. Khozin-Goldberg, I., Shrestha, P. and Cohen, Z.(2005).Mobilization of arachidonyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1738:63–71
77. Kirk, D.L., and Kirk, M.M. (1986). Heat shock elicits production of sexual inducers in *Volvox*. *Science*. 231: 51-54.
78. Kirsop,B. and Doyle,A.(1991).Maintenance of microorganisms and cultured cells, London: Academic press Ltda. 308 pp.
79. Kruger,G.H. and Eloff,J.N. (1978). The effect of temperature on specific growth rate and activation energy of microcystis and *Synechococcus* isolates relevant to the onset of natural blooms. *J. Limnol S Afr*, 4:9-25
80. Laing,I. and Ayala, F.(1990). Commercial mass culture techniques for producing microalgae. En: Introduction to Applied Phycology. Akatsuda, I.(ed),pp:447-477 SPB Academic Publishing Bv, The Hague. 277-290 pp.
81. Lau,P.S., Tam,N.F. and Wong,Y.S. (1995). Effect of Algal density on Nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental pollution*, 89:59-66
82. Lavoie,A.J.and De la Noue. (1985). Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: A new approach for Wastewater Biological Tertiary Treatment. *Wat. Res*,19:1437-1442.
83. Leal,E.(1998). Manual de cultivo para microalgas, laboratorio de Biotecnología de microalgas. Universidad del Atlántico. Barranquilla.118 p.
84. Lee, C. and Passon, B.(1994) High density algal photobioreactors using light emitting diodes. *Biotechnol Bioengin*, 44:1161-1167
85. Lee,R.F., Loeblich A.R.(1971).Distribution of 21:6 hydrocarbon and its relationship to 22:6 fatty acid in algae. *Phytochemistry*, 10:593-602
86. Li, Yanqun., Horsman, M., Wang, Bei., Wu, Nan and Lan, Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl.Microbiol.Biotechnol*.81;4:629-636.

87. Liu,Z.,Wang,G. and Zhou,B.(2007). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technol*, 15:237-249.
88. Malick,K.A.(1993). Preservation of unicellular green-algae by liquid-drying. *J.Microbiol. Methods*, 18:41-46
89. Marsh,B.J. and Weinstein,B.D.(1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*. 7:574-576.
90. Mazzuca, T., García, C., Molina, E., and Chisti Y. (2006). Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*. *Bioprocess Biosyst. Eng*, 28:243-250,
91. McCombie,A.M.(1960). Actions and interactions of temperature, light intensity and nutrient concentration on the growth of the green alga, *Chlamydomonas reinhardi* Dangeard, J. Fish. RES. Board Canada, 17; 6: 871.
92. Merzlyak, M., Chivkunova, O., Gorelova, O., Reshetnikova, I., Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I. and Cohen Z.(2007).Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J Phycol* 43:833–843
93. Metzger,P. and Largeau,C.(2005). *Boytrococcus braunii*: A rich source for hydrocarbons and related lipids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 66:486-496
94. Mora, R., Moronta, R., Ortega, J., Morales, E. (2004).Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la Represa de Tulé, Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. *Cie*, 12;2:117-124
95. Moronta, R., Mora, R., Morales, E.(2006).Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas.*Rev.Fac. Agron.*;1:28-43.
96. Morris,G.J.(1978).Cryopreservation of 250 strains of Chlorococcales by method of two step cooling. *Br Phycol J*, 13:15-24.
97. Müller,J., Friedl,T., Hepperle,D., Lorenz,M.and Day,J.G. (2005) Distinction between multiple isolates of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) and testing for conspecificity using amplified fragment length polymorphism and its rDNA sequences. *Journal of Phycology*, 41:1236–1247.
98. Oh-Hama, T., Miyachi, S. (1988). *Chlorella*,.In M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka (eds.), *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge.3-26 pp

99. Payer, H.D., Chiemvichak, Y., Hosakul, K., Kongpanichkul, C., Kraidej, L., Nguitragul, M., Reumanipytoon, S. and Buri, P. (1980). Temperature as an important climatic factor during mass production of microscopic algae. En: *Algae Biomass*, Shelef, G. y Soeder, C., eds. Elsevier North Holland Amsterdam. 787-798 pp
100. Paoletti, M. (1976). Unsaponifiable matter of green and blue-green algal lipids as a factor of biochemical differentiation of their biomasses. total unsaponifiable and hydrocarbon fraction. *Lipids*, 11: 258-265
101. Piorreck, M., Baasch, K., Pohl, P. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, Lipids and Fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimen. *Phytochemistry*, 23: 207-216
102. Pirt, M., Pirt S. (1977). Photosynthetic production of biomass starch by *Chlorella* in a chemostat culture. *J Appl Chem Biotechnol*, 27:643
103. Qu, Q and Sommerfeld, M. (2003). Selection of high performance microalgae for bioremediation of nitrate contaminated ground water. Final Report of Grant Number 01-HOobR-I BiotArizona State University 13 pp.
104. Raven, J.A. (1988). Limits to growth. En: *Microalgal Biotechnology*. Borowitzka, M.A. Borowitzka L.J. (eds), pp: 257-287. Cambridge University Press.
105. Reynolds, C. S. (1998). The state of freshwater ecology. *Fresh Biol.* 39: 741-753
106. Richmond, A. (1980) Handbook of microalgal mass culture. Ed. CRC Press, Inc. Boca Raton Florida, USA, 198 pp.
107. Rodolfi, L., Chini, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 2:100-112
108. Rosales, N., Bermudez, J., Moronta, R. y Morales, E. (2007). Gallinaza: un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1: 41-49
109. Rosowski, J., Hoshaw, R. (1970). Staining algal pyrenoids with carmine after fixation in an acidified hypochlorite solution. *Stain Technology*, 45;6: 293.
110. Salomon, R., Albarracín, I. y Pio, G. (2003). Sensibilidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda* a la Cipermetrina. Fase preliminar. <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>.

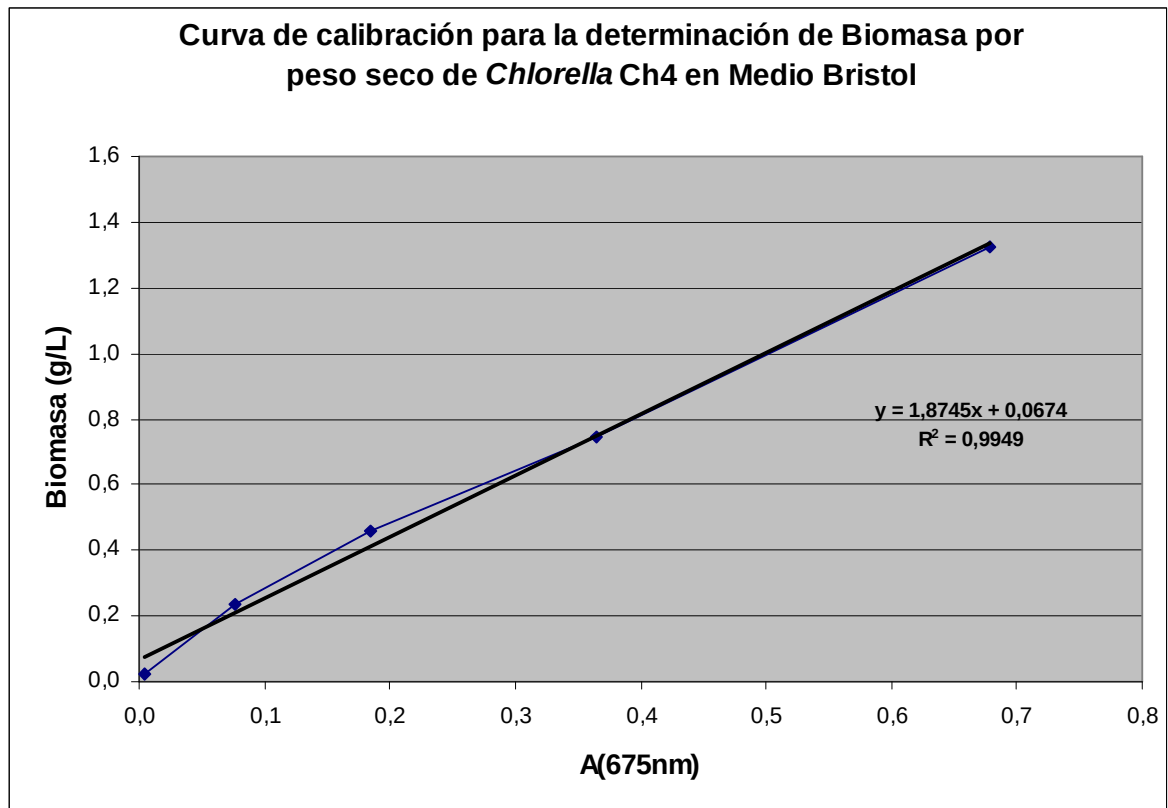
111. Sánchez, A., Cerón, M., Contreras, A., García, F., Molina E., Chisti, Y. (2002). Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch cultures. *Enz Microb Techn* 31: 1015-1023.
112. Sánchez, A., Cerón, M., Contreras, A., García, F., Molina E., Chisti, Y. (2003). Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochl Eng J*, 16: 287-297
113. Sansawa, H. and Endo, H. (2004). Production of Intracellular phytochemicals in *Chlorella* under Heterotrophic conditions. *J Bioscience Bioeng*, 6:437-444
114. Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001). *Biotecnologia Industrial*, vol.2, Editora Edgar Blücher Ltda.
115. Schoen, S. (1988). Cell counting. En: *Experimental Phycology. A laboratory Manual*. Lobban, C.S., Chapman, D.J. y Kremer B.P. (eds). Cambridge University Press. 16-22 pp
116. Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J. and Roessler, P. (1998). US department of Energy's Office of Fuels Development. July 1998. A look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program- Biodiesel from algae. 294 pp
117. Sheffer, M., Fried, A., Gottlieb, H., Tietz, A., Avron, M. (1986). Lipid composition of plasma-membrane of the halotolerant alga, *Dunaliella salina*. *Biochim. Biophys. Acta*. 857: 165-172.
118. Shi, X.M., Jiang, Y.; Chen, F. (2002). Heterotrophic production of biomass and lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 312-318.
119. Simon, R.D. (1971). Cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*: a reserve material consisting of copolymers of aspartic and arginine. *Proc Natl Acad Sc*, 68:265-270,
120. Sobczuk, T., García, F. (2006). Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 28: 243-250
121. Soeder, C.J. (1980). Massive cultivation of microalgae: results and prospects. *Hydrobiologia*, 72:197-209.

122. Soeder,C.J.and Stengel,E.(1974).Physico Chemical factors affecting metabolism and growth rate En: Algal Physiology and Biochemistry. Stewart WDP ed. University of California Press, Berkeley.
123. Sommer, U.(1983). Nutrient competition between phytoplankton species in multispecies chemostat experiments. *Arch. Hydrobiol*, 96: 399-416.
124. Sommer, U.(1988).Phytoplankton succession in microcosm experiment under simultaneous grazing presence and resource limitation. *Limnol Oceanogr*, 33: 1037-1054.
125. Soong,P.(1980).Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. En: Algae Biomass: Production and Use. Shelef, G & Soeder, CJ (eds), 97-114 pp
126. Sorokin,C.(1959).Tabular comparative data for the low and high temperature strains of *Chlorella*. *Natur*, 184:613-614
127. Sorokin,C.(1973).Tabular Dry weight, packed cell volumen and optical density. En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement. Stein J.R.(ed.) Cambridge Press. Cambridge,321-343 pp.
128. Spolore,P.,Joannis-Cassans,C.,Duran,E. and Isambert,A.(2006).Commercial applications of microalgae. *J. Biosc. Bioeng*, 101: 87-96
129. Sournia,A.(1974).Circadian peridicities in natural populations of marine phytoplankton. *Adv.mar.Biol*, 12:325-389
130. Staley,J.T., Bryant,M.P., Pfenning,N. and Holt,J.G.(1989).Bergey's manual of Systematic Bacteriology.. Williams & Wilkins, Baltimore. 3: 1710-1806
131. Stewart,W.D and Pearson,H.(1970). Effect of aerobic and anaerobic conditions on growth and metabolism of blue-green algae. *Proc.R. Soc. London Ser. B*, 175: 293- 311
132. Tam,N.F.and Wong,Y.S.(1989). Wastewater Nutrient Removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Envir Poll.*; 58:19-34
133. Tam N.F., Wong J.P., Wong,Y.S. (2001).Repeated use of two *Chlorella* species *C. vulgaris* and WW1 for cyclic nickel biosorption. *Envir Poll*, 114:85-92
134. Taylor,F.J.R.(1980).Basic Biological Features of Phytoplankton Cells. En: The Physiological Ecology of Phytoplankton. Morris, I. (ed.),. Blackwell Scientific Pub. Oxford. 3-56 pp

135. Thompson, P.A. and Harrison, P.J. (1992). Effects of nonspecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific Oyster (*Crasostrea gigas*) larvae. *Mar Biol*, 113:645-654.
136. Tornabene, T., Holzer G., Lien S. and Burris, N. (1983) Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleoabundans*. *Enzyme Microb Technol* 5:435–440,
137. Umoren, M., Lind O. (2005). Cell volume distribution dynamics of *Chlorella vulgaris* Beij. In batch cultures under continuous light. *Biotech Let*, 27: 347-354.
138. Utting, S.D. (1985). Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquaculture*, 56:123-138
139. Vieira, A.H.H. and Klaveness, D. (1986). The utilization of inorganic nitrogen compounds as sole nitrogen source by some freshwater phytoplankton. *Nord. J. Bot.* 6: 93-97
140. Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., Garland, C.D. (1989). Fatty acids and lipid composition of ten species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128: 219-240
141. Voltolina, D., Gomez, H. y Correa, G. (2005). Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures with artificial wastewater, under a simulated light and temperature cycle. *Biores. Technol.* 96: 359-362.
142. Vonshak, A. and Richmond, A. (1981). Photosynthetic and respiratory activity in *Anacystis nidulans* adapted to osmotic stress. *Plant Physiol*, 68(2): 504–505.
143. Vonshak, A., Abeliovich, A., Boussiba, A., Arad, S. and Richmond, A. (1982). Production of *Spirulina* biomass; effects of environmental factors and population density. *Biomass*. 2:175-85
144. Wang, B., Zarka, A., Trebst, A., and Boussiba, S. (2003). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *J. Phycol.* 39:1116–24.
145. Warren, A., Day, J.G. and Brown, S. (1997) Cultivation of algae and protozoa.: En: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Walter MV (eds) Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington, 61-71pp
146. Wen, Z.Y., Jiang, Y. and Chen, F. (2002). High cell density culture of the diatom *Nitzschia laevis* for eicosapentaenoic acid production: fed-batch development. *Process. Bioch*, 37:1447-1453.

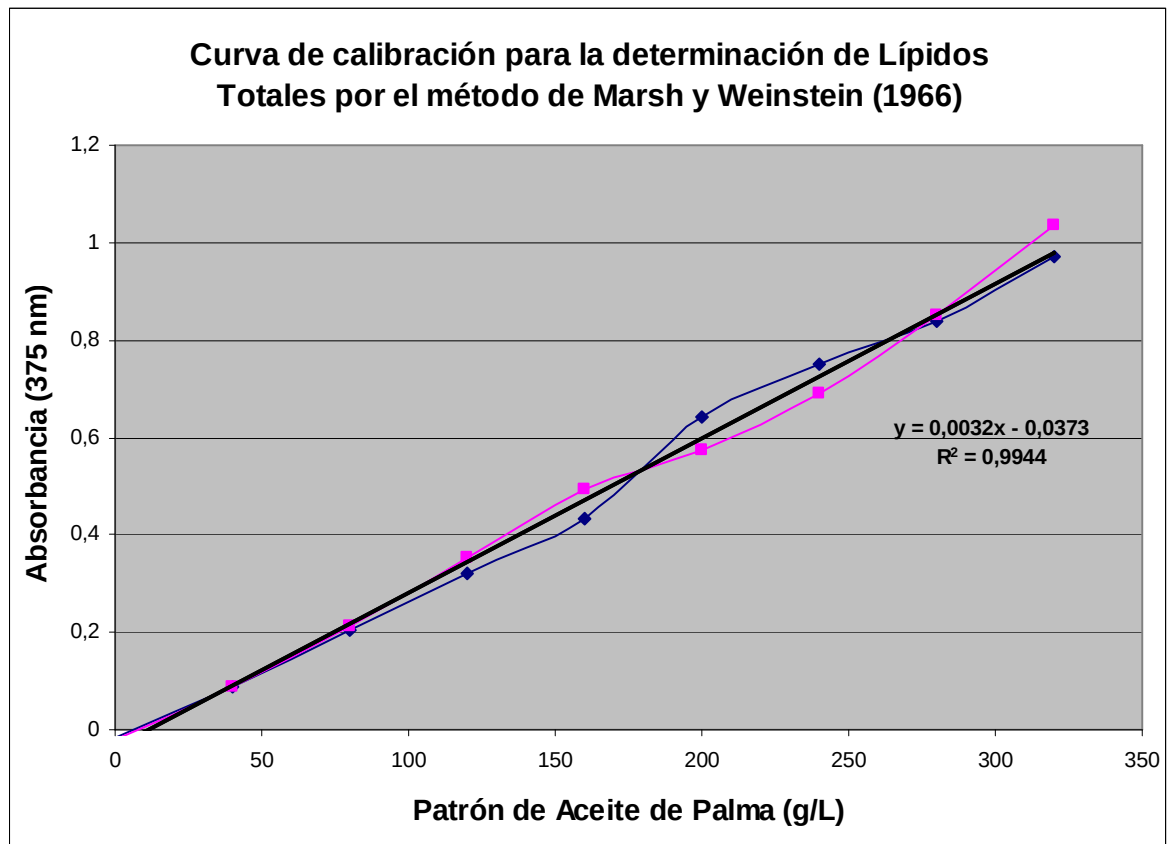
147. Wiessner,W.; Schnepf,E. and Starr,R.C.(1995). Algae, environment and human affairs. Bristol, UK: Bioprocess Ltda. 80 pp
148. Wikfors,G.and Masao,O.(2001). Impact of Algal Research in Aquaculture. *J. Phycol*, 37:98-974
149. Wu,Q.Y., Yin,S., Sheng,G.Y.and Fu,J.M.(1994).New discoveries in istudy on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae. *Sci China*, 37: 326-335
150. Xiong, W., Li, X., Xiang, J., and Wu, Q. (2008). High-density fermentation of microalgae *Chlorella protothecoides* in bioreactor for micro-biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol.*; 78:29-36
151. Xu,H., Miao,X.and Wu,Q.(2006).High quality biodiesel production from a microalgae *Chlorella protothecoides* by heterotrophic grow in fermenters. *Journ Biotechn*,126: 499-507
152. Yamaguchi, K. (1997). Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *J. Appl. Phycol*. 8:487–502.
153. Yang,Y.F., Feng,C.P., Inamori,Y. and Maekawa,T.(2004).Analysis of energy conversión characteristics in liquefaction of algae. *Res Cons Recycl* ,43:21–33.
154. Zhang, X., and Watanabe, M. M. (2001). Grazing and growth of the mixotrophic chrysomonad *Poterioochromonas malhamensis* (Chrysophyceae) feeding on algae. *J. Phycol*. 37:738–43.
155. Zhu,C.J. and Lee,Y.K. (1997).Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*,9: 189-194

ANEXO 1



Como puede observarse en la gráfica, el coeficiente de correlación fué de 0,9949 que se considera significativo en torno a la linealidad de la curva pues explica en más del 99% el ajuste del modelo lineal probado. No existieron valores perdidos ni *outliers* y el número de corridas para el ajuste de 5 y el valor de $p > 0,05$ (no significativo) ratifican la linealidad y el ajuste de los datos a este modelo.(Análisis no presentado). Por lo tanto, los datos de la curva de calibración, se ajustan al modelo lineal en el cual se basa la ley de Beer para los rangos estudiados.

ANEXO 2



Como puede observarse en la gráfica, el coeficiente de correlación fué de 0,9944 que se considera significativo en torno a la linealidad de la curva pues explica en más del 99% el ajuste del modelo lineal probado. No existieron valores perdidos ni *outliers* y el número de corridas para el ajuste de 5 y el valor de $p > 0,05$ (no significativo) ratifican la linealidad y el ajuste de los datos a este modelo.(Análisis no presentado). Por lo tanto, los datos de la curva de calibración realizados por duplicado se ajustan al modelo lineal en el cual se basa la ley de Beer para el rango de concentraciones estudiado: de 0 ppm a 320 ppm.

ANEXO 3

COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

MEDIO DE CULTIVO BRISTOL (Starr & Zeikus, 1993)

SOLUCIÓN DE MACRONUTRIENTES	
Compuesto	Cantidad en g/L
NaNO ₃	0,25
CaCl ₂ •H ₂ O	0,025
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,075
K ₂ HPO ₄	0,075
NaCl	0,025
KH ₂ PO ₄	0,175
KOH	0,031
EDTA	0,05
FeSO ₄ •7H ₂ O	0,005
H ₂ SO ₄	0,0001
H ₃ BO ₃	0,01
SOLUCIÓN ELEMENTOS TRAZA (1 mL/L)	
Compuesto	Solución madre (g/L)
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,882
MnCl ₂ •4H ₂ O	0,144
MoO ₃	0,071
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,157
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	0,049

MEDIO BG11 (Rippka et al., 1979)

Compuesto	Cantidad
SOLUCIÓN I (500 mL)	
NaNO ₃	75 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	3.75 g
CaCl ₂ •2H ₂ O	1,8 g

SOLUCIÓN II (500 mL)	
K ₂ HPO ₄	2 g
EDTA	0,05 g
SOLUCIÓN III (500 mL, sensible a la luz)	
Citrato de hierro (III) y amonio	0,3 g (No adicionado)
Ac. Cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	0,3 g
SOLUCIÓN V (1000 mL)	
H ₃ BO ₃	2.86 g

MnCl ₂ *2H ₂ O	1,84 g
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,22 g
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	0,39 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,08 g
Co(NO ₃) ₂ *6H ₂ O	0,05 g
Para 1L de medio: 10 mL de solución I, 10 mL de solución II, 10 mL de solución II y 1 mL de solución V	

MEDIO DE CULTIVO AL / MEDIO ALGAL (Fabregás *et al.*, 1985)

Compuesto	Concentración (g/L)
NaNO ₃	1,7 (Reducido al 10%)
NaH ₂ PO ₄	0,156
HIERRO	
Citrato férrico	0,67
EDTA	2 mM
MICRONUTRIENTES	
ZnCl ₂	0,0136
ZnSO ₄	0,0287
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,0242
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	0,0242
CoCl ₃	0,00165
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,00249
EDTA	640 μM
VITAMINAS	
Tiamina	0,35
Biotina	0,05
B ₁₂	0,03

MEDIO DE CULTIVO BRISTOL 2X (Starr & Zeicus, 1993)

SOLUCIÓN DE MACRONUTRIENTES	
Compuesto	Cantidad en g/L
NaNO ₃	0,5
CaCl ₂ •H ₂ O	0,05
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,15
K ₂ HPO ₄	0,15
NaCl	0,05
KH ₂ PO ₄	0,35
KOH	0,062
EDTA	0,1

FeSO ₄ •7H ₂ O	0,01
H ₂ SO ₄	0,0002
H ₃ BO ₃	0,02
SOLUCIÓN ELEMENTOS TRAZA (2 mL/L)	
Compuesto	Solución madre (g/L)
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,882
MnCl ₂ •4H ₂ O	0,144
MoO ₃	0,071
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,157
Co(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	0,049

ANEXO 4

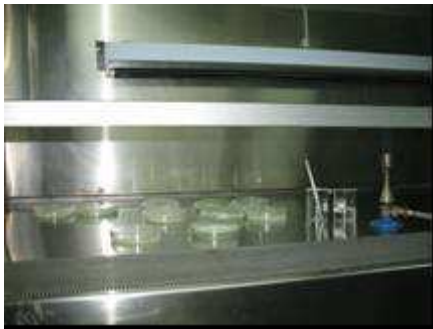
PROCEDIMIENTOS DE TOMA DE MUESTRA, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROALGAS



Recolección Muestra



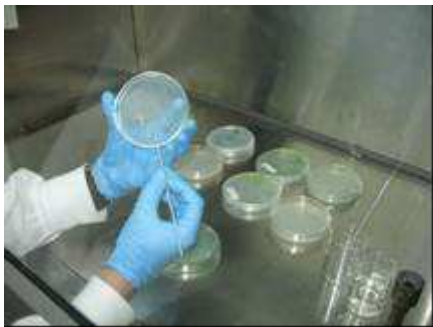
Incubación Muestra



Siembra masiva en placa de agar



Cultivos en placa



Aislamientos de microalgas en placas de agar



Banco de crecimiento y mantenimiento de algas