

AGR  
0623  
EJ. 2

hemeroteca.

044520

EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE LA MICROALGA  
(CHLORELLA SOROKINIANA) PARA LA PRODUCCION DE BIODISEL.

AUTORES:  
JULIAN LIBARDO SANCHEZ VILLARRAGA  
JORGE EDUARDO PADILLA RINCON

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES  
INGENIERIA AGRONOMICA  
VILLAVICENCIO- META  
2010

**EVALUACION DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE LA MICROALGA  
(CHLORELLA SOROKINIANA) PARA LA PRODUCCION DE BIODIESEL.**

**AUTORES:  
JULIÁN SÁNCHEZ VILLARRAGA  
JORGE EDUARDO PADILLA RINCÓN**

**TITULO A OBTENER:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

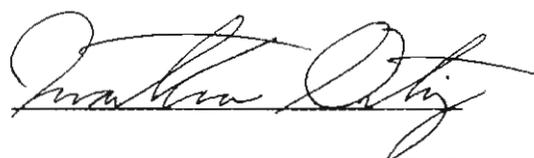
**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:  
ECOSISTEMAS ESTRATÉGICOS NATURALES Y TRANSFORMADOS DE LA  
ORINOQUÍA COLOMBIANA**

**DIRECTOR: MARTHA LUCIA ORTIZ MORENO, Msc  
CODIRECTOR: CAROLL EDITH CORTÉS CASTILLO, Esp.**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES  
VILLAVICENCIO-META  
2010**

**NOTA DE ACEPTACION**

-----  
-----  
-----  
-----



**DIRECTOR**

-----

**CODIRECTORA**

## AGRADECIMENTOS

Los autores expresan su gratitud a la Universidad de los Llanos y de manera especial a M.Sc. Martha Lucia Ortiz; a la Química Caroll Edith Cortés y a la profesional en Acuicultura Angélica Otero, quienes en forma dedicada nos apoyaron en este proyecto de investigación.

Al Instituto de Limnología de la Universidad de Sevilla (España), a los directivos del centro de investigación (IIOC), en especial el Grupo de Investigación sobre Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos GRITOX.

A nuestras familias, Guillermo Sánchez Bernal, María Digna Villarraga Suarez, David Guillermo Sánchez Villarraga, Adriana Amelia Sánchez Villarraga. A mis sobrinos: Ana Sofía solano Sánchez y Emanuel David Sánchez Aldana; Jorge Antonio Padilla, Ruth Delina Rincón, Nini Joanna Padilla, Heidi yunan Padilla, Ruth Aydines Padilla y a todos los compañero que nos brindaron apoyo en este dispendioso trabajo pero muy satisfactoria para nuestra formación profesional y personal.

Nuestro agradecimiento para aquellas personas que por razones de azar, al escribir estas líneas olvidamos mencionar. Ellas también merecen nuestro aprecio.

Julián Libardo Sánchez Villarraga  
Jorge Eduardo padilla  
2010

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>PAG.</b>
1. INTRODUCCIÓN	6
2. JUSTIFICACIÓN	8
3. OBJETIVOS	
3.1. OBJETIVO GENERAL	9
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
5. MARCO TEÓRICO	12
6. METODOLOGÍA	22
7. RESULTADOS	24
8. CONCLUSIONES	37
9. BIBLIOGRAFÍA	38
10. TABLAS Y ANEXOS	39

## RESUMEN

Con el presente estudio se evaluaron las condiciones de cultivo de la microalga (*Chlorella sorokiniana*) para desarrollar un protocolo que permita obtener biomasa algal con diferentes aplicaciones entre ellas la obtención de biodiesel.

Se evaluó medios de cultivo inorgánicos como Guillard, Sueoka y Remital además de medios orgánicos formados por lixiviado avícola en proporciones 30, 50 y 80%.

Se encontró que el mejor crecimiento de *C. sorokiniana* se dio en el medio Remital (1g/lit) con una concentración celular de  $8,5 \times 10^8$  células/ml a los 13 días con iluminación permanente, 25°C y aireación. La cepa analizada de *C. sorokiniana* mostró un bajo rendimiento lo que indica que no es adecuada para la producción de biodiesel pero por la calidad de sus ácidos grasos puede ser utilizada como alimento vivo para larvas de peces, fuente de proteínas o en la industria cosmética.

**Palabras clave:** *Chlorella sorokiniana*, medios de cultivo, biomasa algal.  
© 2010.

## 1. INTRODUCCION

Actualmente la humanidad afronta una grave problemática debido al aumento de la demanda energética mundial, agotamiento de los combustibles fósiles, incremento del precio del petróleo y las dificultades ambientales causadas por los gases de efecto invernadero como son la contaminación local del aire y el calentamiento global.

Esta situación demanda urgentemente fuentes alternativas de energía basadas en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente, que además posibilitan la captura de CO<sub>2</sub>. Una alternativa energética promisoría que ha resultado muy atractiva en años recientes es el biodiesel (Donohue & Codgell, 2006; Schenk et al., 2008; Meng et al., 2009; Rodolfi et al., 2009).

El biodiésel es un biocombustible que se fabrica a partir de cualquier grasa animal o aceites vegetales, que pueden ser ya usados o sin usar. Se suele utilizar girasol, canola, soja o jatropha, los cuáles, en algunos casos, son cultivados exclusivamente para producirlo. Se puede usar puro o mezclado con gasoil en cualquier proporción en motores diésel. El principal productor de biodiésel en el mundo es Alemania, que concentra el 63% de la producción. Seguido por Francia con el 17%, Estados Unidos con el 10%, Italia con el 7% y Austria con el 3%. (<http://www.biodisol.com>) [(Daniel ariza 2006)]

En los últimos años se ha promovido un gran interés por los biocombustibles, debido al aumento en la demanada de combustible y la disminucion considerable de las reservas de petroleo en el mundo y también debido a que los gobiernos pretenden disminuir su dependencia de los combustibles fósiles para así lograr mayor seguridad energética. Además, se mencionan diversas ventajas de los biocombustibles con respecto a otras energías, como la menor contaminación ambiental, la sustentabilidad de los mismos y las oportunidades para sectores rural sin embargo, con esta visión se pone en riesgo la seguridad alimenticia, ya que se necesita gran cantidad de tierras fértiles para la producción de estas especies oleaginosas.

En comparación con otras energías alternativas, como la proporcionada por el hidrógeno, el reemplazo de los combustibles fósiles por biocombustibles en el sector de transporte puede ser realizado con menores costos, debido a que no requieren grandes cambios en la tecnología actualmente utilizada, ni tampoco en el sistema de distribución. Utilizar otro tipo de energía, como la obtenida a través del hidrógeno, que se basa en una tecnología totalmente distinta, requeriría grandes cambios en el stock de capital. Esto no implica que se deban descartar nuevas fuentes de energía, sino que los biocombustibles serán los que tendrán más crecimiento en el corto plazo. (<http://www.zonaeconomica.com/biocombustibles>) [(Federico Anzil, junio de 2007)]

Las algas son organismos acuáticos que capturan luz solar y el dióxido de carbono para hacer la fotosíntesis y así producir su energía, además producen aceites vegetales que se pueden transformar en biodiesel. El rendimiento en producción de biodiesel con algas es 300 veces superior al que se alcanza con soja y unas 25 veces al que se consigue con palma. A ello hay que añadir el tiempo record de crecimiento de las algas que es solo de unos pocos días lo que contrasta con los tiempos de crecimiento mucho más largos de las plantas oleaginosas.

Recientemente se viene estudiando el cultivo de algas microscópicas como una opción de gran potencial para producción de combustibles líquidos para el transporte ya que reducen las emisiones de gases de efecto invernadero y presentan una productividad muy elevada. Cuando se comparan las productividades ( $\text{m}^3$  de aceite producidos por  $\text{km}^2$  de superficie) las algas alcanzan rendimientos ( $\text{m}^3$  aceite producido por  $\text{km}^2$  cultivado) de 10.000-20.000  $\text{m}^3/\text{km}^2$ , que resultan mucho más elevado que el alcanzado por la colza (120  $\text{m}^3/\text{km}^2$ ), la soja (40  $\text{m}^3/\text{km}^2$ ), la mostaza (130  $\text{m}^3/\text{km}^2$ ) y la palma (600  $\text{m}^3/\text{km}^2$ ).

Las cepas de *Chlorella* tienen un gran potencial como fuente para la producción de biodiesel por su rápido y fácil cultivo. El contenido de lípidos en *Chlorella* bajo condiciones de crecimiento general es del 14-30% de la biomasa seca (Illman *et al.*, 2000; Spolaore *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006), pero no se conocen los requerimientos comerciales para la producción de biodiesel.

*Chlorella sorokiniana* es una microalga que ha sido estudiada intensamente en los últimos años por su capacidad para producir ácidos grasos de interés comercial tanto para la industria de alimentos y concentrados como para la producción de biocombustibles (Chen, 1996; Miao and Wu, 2004).

El cultivo de micoralgas tiene una gran ventaja respecto a los otros cultivos de producción de biodiesel, ya que para tener la misma producción de biocombustible se necesita mucho menos cantidad de tierra fértil.

El cambio del uso de la tierra de agricultura de pan coger a industrial para la producción de biocombustibles en el departamento del Meta pone en riesgo la seguridad alimentaria de la región (Guevara, 2008). Por lo tanto se requiere desarrollar alternativas tecnológicas que permitan la obtención de biocombustibles sin tener que sacrificar el suelo utilizado para la producción de alimentos. *Chlorella* se vislumbra como una alternativa promisoría ya que para su cultivo no se requiere suelo y además no es considerada como un alimento en nuestra dieta alimenticia.

## 2. JUSTIFICACION

Existe una crisis energética mundial y dentro de las alternativas que se perfilan se encuentra el biodiesel. El biodiesel se obtiene principalmente de fuentes vegetales como la palma africana, pero este cultivo tiene un alto impacto ambiental y social, en este escenario surgen las microalgas como una opción para producir biodiesel de alta calidad utilizando agua residual y secuestrando carbono (Sawayamal et al., 1995 Chisti,2008)

Este trabajo esta enfocado en estandarizar y desarrollar un protocolo que permita obtener biomasa algal, la cual tiene diferentes aplicaciones entre ellas la obtención de biodiesel. La *Chlorella* tiene un gran potencial como fuente para la producción de biodiesel por su rápido crecimiento y fácil cultivo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar las curvas de crecimiento de *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella nativa* en medio sueoka, extracto de suelo y lixiviados avícolas.
- Evaluar los medios de cultivo: orgánico (lixiviado al 30%, 50% y 80%) e inorgánico (Guillard, Sueoka y Remital) en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana*.
- Establecer un protocolo para la producción de inóculo de la microalga *Chlorella sp.*

#### 4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

El surgimiento del nuevo mercado de los agrocombustibles para satisfacer la demanda de los países con grandes industrias del sector automotriz ha generado en Latinoamérica un afán desmedido por empezar a producir biodiesel. La agricultura empieza a sustituir el petróleo para reducir la dependencia del hidrocarburo. Es así como en los llanos orientales se esta incrementando la compra de tierras que serán dedicadas a la siembra de palma africana.

Los biocombustibles son un tema que está generando considerable atención últimamente. En EEUU se están invirtiendo grandes sumas en el desarrollo de los mismos. El etanol a partir de granos o celulosa, y el biodiesel a partir de aceites vegetales son los más conocidos, pero hay muchos otros. Uno de estos es el biodiesel a partir de algas. ( <http://www.ingenieriaquimica.org/articulos/biodiesel> apartir de algas).

La variedad de aceites vegetales que pueden emplearse para la producción de biodiesel es diversa y el rendimiento del proceso depende de la materia prima empleada y la tecnología de procesamiento. Las fuentes actuales de biodiesel comercial incluyen el aceite de soya, canola, palma, maíz, las grasas animales y el aceite residual de cocina. Sin embargo, la producción de biodiesel a gran escala de estas fuentes, no puede satisfacer de manera realista la demanda existente por combustibles para el transporte, ya que desplazaría los suelos agrícolas de su uso para cultivos de pan coger. Por ejemplo, si en América, se cultivara palma de aceite (un cultivo con alta producción de aceite) en un 24% de la tierra cultivable ó un 846% del área cultivable de Estados Unidos (E.U.) sembrada en maíz, sólo se satisfaría el 50% de las necesidades de biodiesel del transporte. Mientras que sólo el 3% del área cultivable de E. U. sería suficiente para producir la biomasa algal necesaria para cubrir la misma demanda, considerando la obtención del 30% del peso seco de las algas en aceite (Chisti, 2007).

Por tanto, las micro algas emergen como una de las opciones más promisorias por su amplia disponibilidad y alta producción de aceite. A diferencia de los cultivos de oleaginosas, las micro algas pueden crecer en lugares fuera de los suelos agrícolas y los bosques como lagos, unidades de fermentación e inclusive aguas servidas (Valderrama *et al.*, 20002; de-Bashan *et al.*, 2004), lo cual minimiza los daños causados a los ecosistemas y las cadenas alimenticias (Sheehan *et al.*, 1998; Chisti, 2007).

En este proyecto se pretender evaluar las condiciones de cultivo de la microalga (*chlorella sorokiniana*) para la produccion de biodiesel, ya que en la Orinoquia colombiana se están llevando multiples proyectos para producción de biodisel pero

no hay un estudio tal que asegure la producción del biocombustible necesario para nuestra zona y la seguridad alimentaria, una buena alternativa de producción de biocombustible para la Orinoquia sin poner en riesgo la seguridad alimentaria es la producción de microalgas como son la (*Chlorella sorokiniana*).

## 1. MARCO TEORICO

### ¿QUÉ ES UN BIOCOMBUSTIBLE?

Según la etimología de la palabra se considera un combustible de origen biológico. Así tal cual incluso el petróleo lo sería, pues procede de restos fósiles de seres que vivieron hace millones de años. Pero se tiende a definir como biocombustible a un combustible de origen biológico obtenido de manera renovable a partir de restos orgánicos.

Esta fue la primera fuente de energía que conoció la humanidad. La madera o incluso los excrementos secos son biocombustibles. Si se administra bien la madera de los bosques puede ser un recurso renovable (mal administrado es un desastre ecológico). Una biomasa sería virutas de madera producto de la limpieza de bosques y de su explotación racional. Toda sustancia susceptible de ser oxidada produce energía, Si esta sustancia procede de plantas, entonces al ser quemada (oxidada) devuelve a la atmósfera el dióxido de carbono que la planta tomó del aire tiempo atrás. Por tanto, si miramos el punto de vista ecológico es un sistema que respeta el medio ambiente, porque no hay un aumento neto de gases de efecto invernadero. [(Martínez 2007)]

### CLASES DE BIOCOMBUSTIBLES

Las fuentes de bioenergía pueden ser biomasa tradicional quemada directamente, tecnologías a base de biomasa para generar electricidad, y biocombustibles líquidos para el sector de transporte.

- La biomasa tradicional es utilizada por los campesinos ya que es la quema de leña o madera para poder hacer sus diferentes alimentos calentar algo. Esta energía es neutra en emisiones de CO<sub>2</sub> (utiliza fotosíntesis reciente), .

- La biomasa para generar electricidad, este sistema es utilizado en países industrializados con elevados recursos forestales, que utilizan madera para generar electricidad claro que esta obtención de madera atenta la seguridad ecológica del país ya que destruye la biodiversidad de los diferentes paisajes de este.

- Con el incremento en la demanda de combustible se vio la necesidad de buscar nuevas alternativas y es hay donde los combustibles liquido y biológico entran a cumplir un gran papel ya que los biocombustibles líquidos proporcionan actualmente aproximadamente la energía equivalente a 20 millones de toneladas

de petróleo (lo que equivale al 1% del combustible utilizado mundialmente para transporte por carretera).

Los biocombustibles que más se utilizan son el etanol y el biodiesel. El etanol puede ser utilizado en motores que utilizan nafta, mientras que el biodiesel puede ser utilizado en motores que utilizan gasoil.

El etanol es un biocombustible a base de alcohol, el cual se obtiene directamente del azúcar. Ciertos cultivos permiten la extracción directa de azúcar, como la caña azucarera (Brasil), la remolacha (Chile) o el maíz (Estados Unidos). Sin embargo, prácticamente cualquier residuo vegetal puede ser transformado en azúcar, lo que implica que otros cultivos también pueden ser utilizados para obtener alcohol. Aunque con la tecnología disponible actualmente este último proceso es muy costoso, se pronostica que ocurran avances en este sentido (las llamadas tecnologías de segunda generación). (Ecopetrol 2008)

<http://www.zonaeconomica.com/biocombustibles> [ (Federico Anzil, junio de 2007)]

## **CRECIMIENTO DE LA PRODUCCION DE BIOCOMBUSTIBLE**

El crecimiento en el sector transporte, se encuentra ligado a una demanda energética y se ha estimado que a nivel mundial y, combinando el factor demográfico (8 mil millones de habitantes en 2020 y 10 mil en 2050) a una tasa anual de crecimiento de la economía mundial del 3,5% durante las próximas dos décadas, debería pasar de 9,3 mil millones de toneladas de combustible a 15 mil millones de combustible (Krogüer 2006). El uso de energía en el sector transporte acarrea graves consecuencias para la calidad del medio ambiente y para el cambio climático mundial, debido a que es responsable del 60% de las emisiones de gases contaminantes a la atmósfera. En la Unión Europea (UE) el transporte es responsable del 21% de las emisiones de gases de efecto invernadero. Para Colombia, en el año 2002, se obtuvieron las siguientes estadísticas: CO: 1.111,93; PST: 49,21; PM10: 35,43, SOx: 105,14, NOx: 234,38 (contaminantes por ton de combustible consumido en 2002) (Desarrollo de Biocombustibles en Colombia, 2005).

Debido al agotamiento de las reservas de combustibles fósiles, actualmente, el precio del petróleo se encuentra en un constante aumento y la necesidad de encontrar fuentes alternativas de energía se hace más evidente. Para contrarrestar la demanda excesiva de combustible, se ha encontrado en los biocombustibles una nueva fuente renovable de energía que ayude a sustentar la demanda energética mundial y a reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> (Hill et al., 2006).

El biodiesel contiene alquil-ésteres de ácidos grasos y gracias a la legislación vigente (Ley 939 de 2004; resolución 1180 de 2006) es una realidad comercial en nuestro país. La demanda de biodiesel ha sido creciente en los últimos años

debido a la normatividad gubernamental que establece la sustitución de hasta un 5% del ACPM con biodiesel en los refineries nacionales a partir de enero del 2008, esto condujo a un crecimiento del área sembrada en palma africana (*Elaeis guinensis*) (Tabla 1 y 2) y el desarrollo de proyectos de plantas extractoras y/o productoras de biodiesel distribuidas en las diferentes regiones del país (Tabla 3 y 4).

**Tabla 1. Hectáreas sembradas en palma africana (*Elaeis guinensis*) en Colombia año 2006.**

	Área sembrada	En producción	En desarrollo
Zona Casanare	76.687	47.582	29.105
Zona Norte	94.224	53.994	40.300
Zona occidental	33.889	25.044	8.845
Zona oriental	95.273	57.025	38.238
Colombia	300.142	183.645	116.498

Fuente: Fedepalma, 2009, CUAL PAGINA

**Tabla 2. Hectáreas sembradas con Palma africana en la región Oriental (año 2006)**

Departamento	Hectáreas sembradas
<b>Meta</b>	110.417
<b>Casanare</b>	11.900
<b>Cundinamarca</b>	1.200
<b>Caquetá</b>	748
<b>Total Región Amazo-Orinoquía</b>	124.095*
<b>Total País</b>	326.033

Fuente: Guevara, 2008 \* Para el año 2008 hay 20000 nuevas hectáreas sembradas aún improductivas.

**Tabla 3. Plantas extractoras de aceite en el Departamento del Meta**

<b>Municipio</b>	<b>Plantas</b>
<b>San Carlos de Guaroa</b>	5
<b>Acacias</b>	7
<b>San Martín</b>	3
<b>Barranca de Upía</b>	1
<b>Cabuyaro</b>	1
<b>Puerto Gaitán</b>	1

Fuente : Guevara, 2008 TITULO DEL DOCUMENTO.

**Tabla 4. Proyectos de producción de Biodiesel en Colombia**

<b>REGION</b>	<b>TON/AÑO</b>	<b>PLANTAS</b>	<b>HECTAREAS</b>	<b>EMPLEOS</b>
<b>COSTA ATLANTICA</b>	286.000	4	182.000	<b>70.000</b>
<b>COSTA PACIFICA</b>	100.000	1	25.000	<b>11.000</b>
<b>MAGDALENA</b>	100.000	1	25.000	<b>11.0000</b>
<b>LLANOS ORIENTALES</b>	235.000	3	59.000	<b>26.000</b>

Fuente: Guevara, 2008.

## **El cultivo de micro algas**

Las micro algas crecen de manera espontánea en ambientes acuáticos y húmedos. para la producción de biocombustibles en masa se lleva a cabo su cultivo controlado en plantas en tierra firme ya que se necesita ponerle las condiciones optimas para su propagación y así en menor tiempo tener producción y con mayor cantidad respecto al tiempo. Diversas son las causas que llevan a ello:

Solo se cultiva la variedad de micro alga adecuada en este caso *Chlorella sorokiniana*, en función de la utilidad que se quiera obtener de ella. Se estima que existen más de 300.000 especies de algas.

Por otro lado el cultivo asegura la producción del volumen de micro algas necesarias controlando aspectos como la extensión del cultivo en caso del proyecto 20-50-100 litros y su rendimiento. poniendole condiciones favorables para su buen desarrollo por ende la producción va a ser mucho más rápido que en condiciones naturales.

También factores medioambientales desaconsejan la recolección o producción de manera artificial de micro algas en el mar. La mayor presencia (por reproducción forzada) o la reducción (por recolección) de algas en la naturaleza alterarían la disponibilidad de alimento de muchos organismos impactando en la cadena trófica. De obtener las microalgas directamente de la naturaleza muchos ecosistemas podrían entrar en colapso suponiendo una gran catástrofe. (<http://biodiesel.com.ar>)

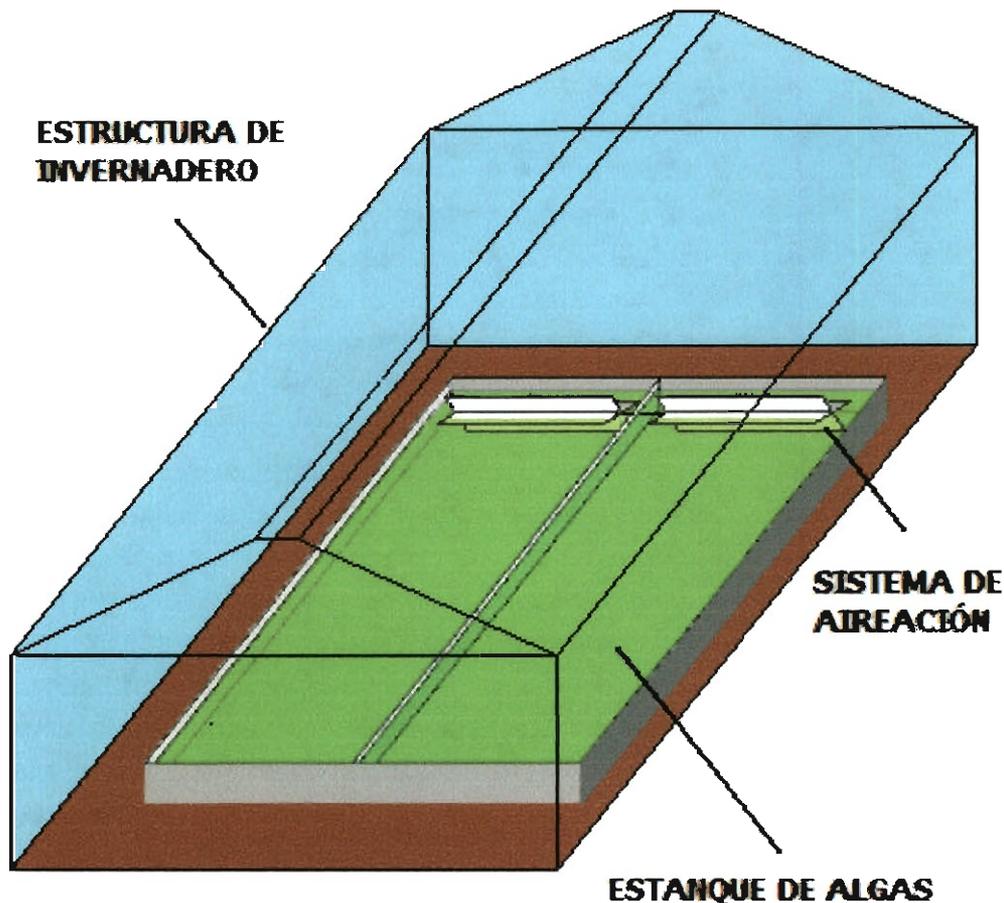
### **Técnicas de cultivo de las micro algas**

Existen tres modalidades de cultivo de algas que las distintas compañías están estudiando. Estas modalidades son:

-Cultivo en estanques al aire libre- La forma más simple de cultivo. Se trata básicamente de piscinas descubiertas expuestas al sol. Al agua de estas piscinas se suministra nutrientes para que las microalgas puedan reproducirse a un ritmo acelerado. Es el sistema menos eficiente aunque el más económico.

-Cultivo de tanques en invernadero- Los tanques de agua en los cuales se reproducen las micro algas están protegidos por invernaderos. Se tiene noticia de diferentes configuraciones de este tipo que van desde auténticos invernaderos en los cuales se encuentran los tanques hasta pequeños estanques en los que se coloca un vidrio o plástico encima.

Las ventajas de este sistema son un mejor control de la temperatura y una pérdida muy reducida de agua. Estos factores favorecen una mayor reproducción de las algas y por lo tanto un mayor rendimiento. Existen empresas productoras que optan por este sistema por considerarlo en un buen equilibrio entre la eficiencia de producción y los costos.

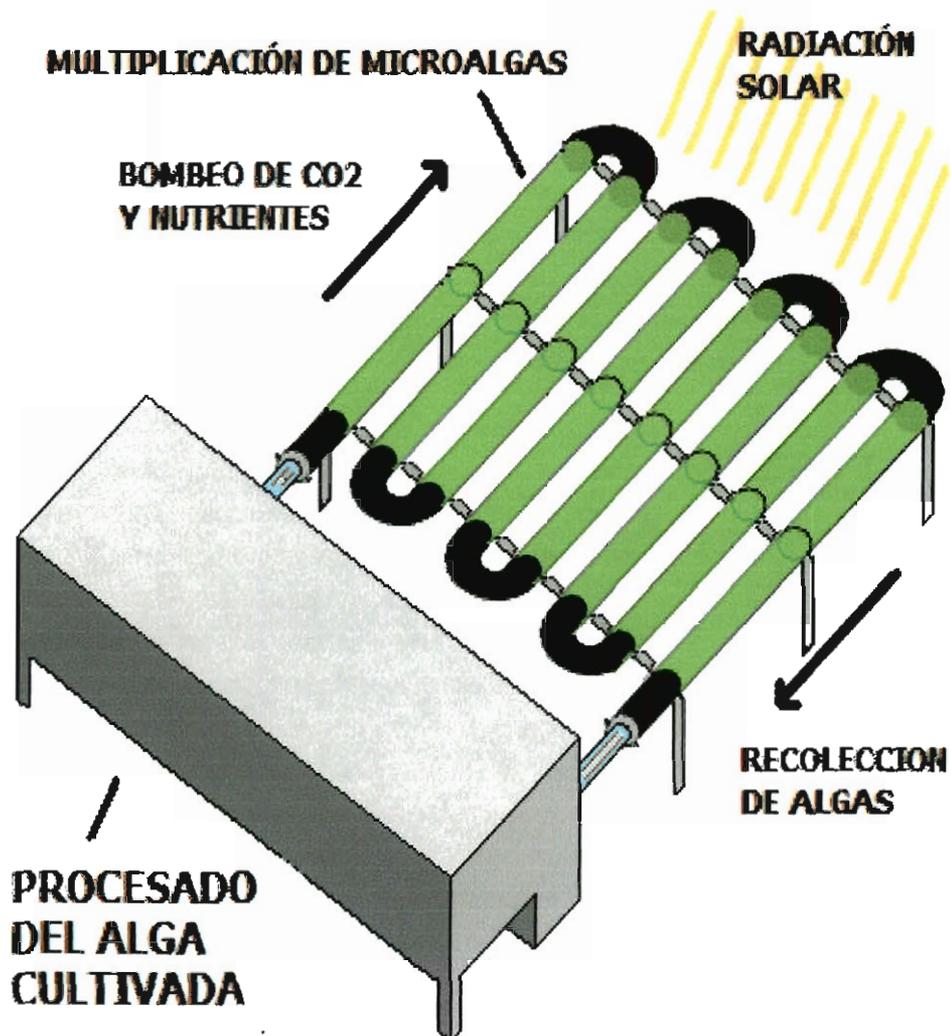


***Invernadero con cultivo de micro algas***  
(<http://www.sitiosolar.com/biocombustibles%20de%20microalgas.htm>)

**-Cultivo en fotobiorreactores-** Los fotobiorreactores son conductos transparentes aislados del exterior en los cuales se desarrollan las microalgas. Estos tubos se colocan al exterior para captar mayor cantidad de radiación solar. Un sistema controlado informáticamente se encarga de suministrar a las micro algas  $\text{CO}_2$  y nutrientes para optimizar al máximo su productividad. Son a priori los sistemas más productivos de todos.

## Esquema de fotobioreactor

(<http://www.sitiosolar.com/biocombustibles%20de%20microalgas.htm>)



***Fotobioreactor "airemar" de la empresa Biofuels systems***



## PIDOS EN LAS MICROALGAS

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

La determinación del contenido oleaginoso de las micro algas resulta complicada a causa de su variación ante condiciones distintas de cultivo; el crecimiento en ambientes desfavorables o bajo situaciones de estrés, frecuentemente conlleva al incremento de la fracción lipídica, aunque en detrimento de la productividad lipídica del cultivo. Los lípidos comprendidos en las micro algas por lo general constituyen del 20 al 50% de su peso seco, sin embargo se han reportado valores en un rango del 1 al 80%, o incluso superiores, como se señalan la Tabla 3 (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991; Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008; Schenk *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009). Las especies que producen más de un 30% de materias grasas se denominan 'oleaginosas'. (Arredondo & Vázquez-Duhalt, 1991).

Los grupos taxonómicos a los cuales pertenecen las microalgas oleaginosas son diversos. En los ejemplares eucariontes, el contenido lipídico es considerado como propio de la especie y no del género, de manera tal que este parámetro varía notablemente entre las especies individuales de cada grupo taxonómico (Ben-Amotz *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 2008). No obstante, de acuerdo con Hu *et al.* (2008), es posible generalizar que micro algas oleaginosas eucariontes de grupos diversos (clorofitas, diatomeas, crisofitas, haptofitas, eustigmatofitas, dinofitas, xantofitas y rodofitas) presentan, bajo condiciones normales de cultivo, una fracción lipídica promedio del 25.1%, magnitud que es superior (45%) en situaciones de estrés. Cabe destacar que la ubicuidad de las algas verdes (clorofitas) en hábitats diversos, además de la facilidad para su aislamiento y desarrollo en condiciones de laboratorio, ha favorecido la identificación de numerosas especies oleaginosas en este grupo, condición que no necesariamente es distintiva del mismo. Las cianobacterias por su parte presentan bajos contenidos lipídicos promedio (9.8%; Hu *et al.*, 2008), sin embargo su aplicación en la producción de biodiesel ha sido sugerida por Rittmann(2008) a causa de la El estudio **Evaluación de las condiciones de cultivo de la microalga (*Chlorella sorokiniana*) para la producción de biodiesel** producción de lípidos paralela al crecimiento y la sencillez para la manipulación genética que ofrecen, en contraste con las especies eucariontes Químicamente los lípidos son sustancias de origen biológico que, siendo escasamente solubles en agua, pueden ser extraídas con solventes orgánicos de baja polaridad. Las estructuras de estas biomoléculas comprenden largas cadenas hidrocarbonadas, unidades de isopreno y grupos funcionales diversos (oxigenados principalmente).

En las micro algas los principales componentes de la fracción lipídica son triacilgliceroles, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos (predominantes en membranas cloroplásticas), fosfolípidos (abundantes en plasmalema y diversos sistemas endomembranosos) y pigmentos (carotenoides, clorofilas, ficobilinas, etc.), aunque compuestos inusuales tales como ácidos grasos halogenados e hidroxilados, alquenonas de cadena larga, entre otros, también ocurren (Cohen, 1986; Arredondo & Vázquez Duhalt, 1991; Metzger & Largeau, 2005; Guschina & Harwood, 2006; Hu *et al.*, 2008). No todos los lípidos micro algales son satisfactorios para la producción de biodiesel, sin embargo los apropiados para ello (ácidos grasos, libres y unidos covalentemente al glicerol y sus derivados) son producidos con frecuencia y constituyen la mayor fracción de los lípidos totales, usualmente del 20% al 40% (Cohen, 1986; Chisti, 2007). Un perfil de ácidos grasos de cadena larga con un bajo grado de insaturación es deseable para la elaboración de biocombustible de calidad (Knothe, 2005).

## 2. METODOLOGÍA

### LOCALIZACIÓN

El proyecto se realizó en la Universidad de los Llanos, sede Barcelona, kilómetro 7 vía a Puerto López, localizada, a 384 m.s.n.m, latitud, 04°04'26.08" longitud, 73°34'50.52" oeste.

### MATERIALES

El alga (*Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella nativa*), papel aluminio, jabón líquido, Cajas de petri, cámara de neubauer, hazas de henle, pipetas pasteur, tapabocas, guantes, recipientes transparentes de vidrio con capacidad de 200ml y 3 lts, recipientes transparentes de plástico con capacidad de 50-250 y 500 lts, lámparas de neón, estantes y soportes de metal, pH metro, aire acondicionado, libreta de apuntes, Mecheras, Baldes, erlenmeyer sencillo, erlenmeyer con desprendimiento lateral, embudo de cerámica para filtración al vacío, Papel filtro, jeringas de 1-5 y 10ml , agua destilada, autoclave, Remital(abono-agroquímico),medios de cultivo (guillard, sueoka, lixiviado avícola), cloro granulado, tiosulfato de sodio, Balanza electrónica,blower, mangueras tipo pecera, Vaso de precipitado, mayas de recolección screen de 57µm, Libreta de apuntes, lápiz, cámara fotográfica.

### MEDIOS DE CULTIVO

#### Lixiviado avícola

Se toma 300 gr de gallinaza o pollinaza, se diluye en 1L de agua; se almacena en un frasco sin tapa durante 8 días. Luego se filtra al vacío en un erlenmeyer con desprendimiento lateral y un embudo de cerámica para ser filtrada filtrada, después de todo esto ya se puede utilizar el medio de lixiviado avícola y para llevarlos al 30-50- y 80 % se hace de la siguiente manera:

300ml del filtrado por 700ml de agua destilada= lixiviado al 30%.

500ml del filtrado por 500ml de agua destilada= lixiviado al 50%.

800ml del filtrado por 200ml de agua destilada= lixiviado al 80%.

#### Medio Remital

Este es un fertilizante completo NPK, también llamado cafetero y es utilizado en muchos cultivos. Se compone de los siguientes elementos:

Tomamos 1g de Remital y se diluye en 1L de agua destilada. Luego de esta dilución, se puede disponer de este medio para el ensayo.

### **Medio Guillard**

Se debe diluir 1 ml de medio guillard en un litro de agua destilada. (Ver anexo).

### **Medio Sueoka**

Se requiere diluir 1ml por cada litro de agua destilada a utilizar. (Ver anexo).

### **Concentración en g/L de Remital**

Utilizamos 15 frascos estériles con capacidad de 200ml y en cada uno aplicamos 5ml de inóculo (*Chlorella sorokiniana*), luego se lleva a volumen con medio Remital (1g-2g-3g-4g y 5g) y hacemos 3 replicas de cada una de las concentraciones anteriormente mencionadas. Hacemos monitoreo del crecimiento algal con una cámara de Neubauer cada 48 horas, durante 15 días. Luego se monitoreaba la densidad de población cada 48 horas con el espectrofotómetro, ya que con la cámara de Neubauer el conteo es más dispendioso.

A los datos obtenidos se les hizo análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de Dunnett.

### 3. RESULTADOS

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

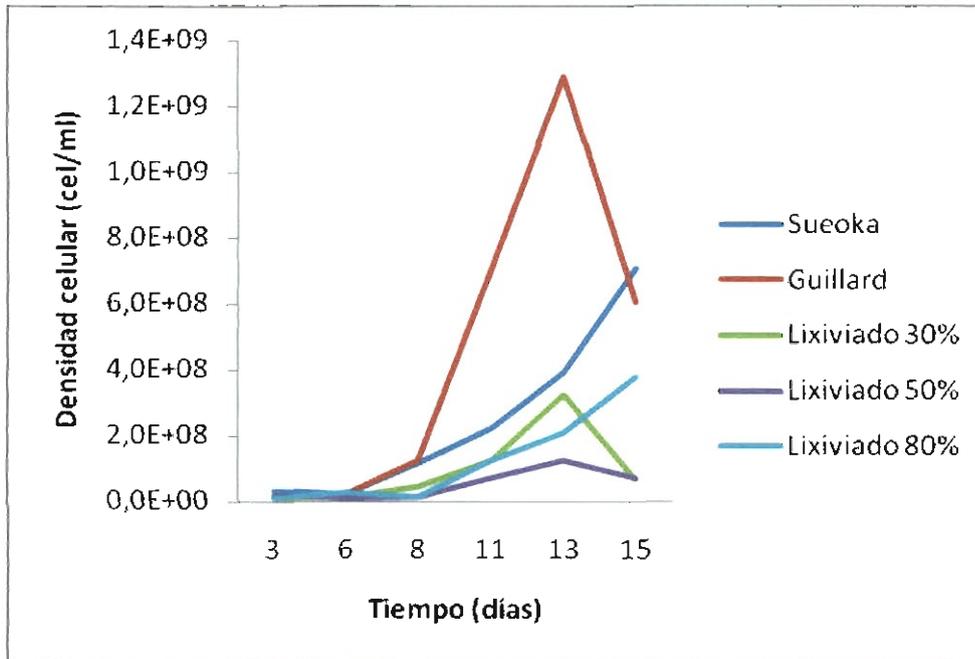
##### 1. Evaluación de los diferentes medios de cultivo lixiviado al 30%, 50% y 80%, Guillard, Sueoka y Remital.

Los datos obtenidos en el experimento (tabla 1) se observa que los mejores medios para su buen y rápido desarrollo son:

- **Chlorella sorokiniana:** El mejor medio es guillard, lixiviado 30% y lixiviado 80%.
  - **Chlorella nativa:** El mejor medio es guillard y sueoka
  - **Chlorella vulgaris:** El mejor medio es lixiviado 30 y sueoka.
- Tabla 1. Tiempo de generación para todas cepas y medios de cultivo.

Medio	Cepa	# Generaciones	Tg
Sueoka	nativa	6,7	2,4E-02
Sueoka	Sorokiniana	4,5	1,6E-02
Sueoka	Vulgaris	6,7	2,4E-02
Guillard	Nativa	6,8	2,5E-02
Guillard	Sorokiniana	6,2	2,2E-02
Guillard	Vulgaris	4,8	1,7E-02
Lixiviado 30%	nativa	3,7	1,3E-02
Lixiviado 30%	Sorokiniana	5,8	2,1E-02
Lixiviado 30%	Vulgaris	6,9	2,5E-02
Lixiviado 50%	nativa	4,8	1,7E-02
Lixiviado 50%	Sorokiniana	1,9	6,9E-03
Lixiviado 50%	Vulgaris	5,3	1,9E-02
Lixiviado 80%	Nativa	4,3	1,6E-02
Lixiviado 80%	Sorokiniana	5,6	2,0E-02
Lixiviado 80%	Vulgaris	5,2	1,9E-02

Figura 1. Crecimiento de *C. sorokiniana* en los diferentes medios de cultivo.

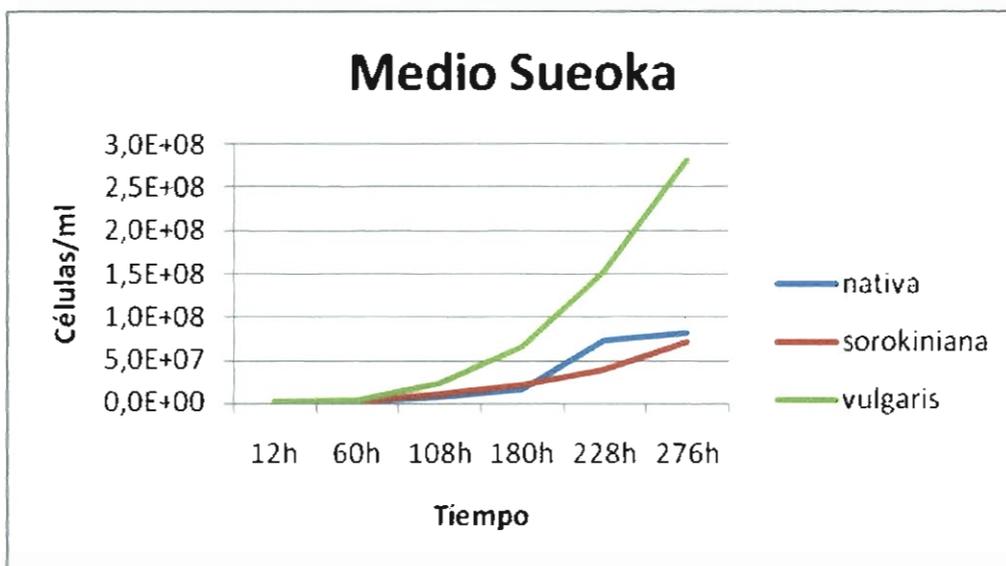


Como podemos ver en la figura No. 1 el medio que presento mejor comportamiento fue el guillard con una densidad  $1,3E+09$  en un tiempo de trece días a pesar de observarse una decrecimiento considerable-después de ese día, lo cual indica que el mejor momento para la cosecha es a los trece días, seguido por el medio sueoka y el de más bajo comportamiento fue el de lixiviado 50% con una densidad de en un tiempo de trece días.

Los medios sueoka y lixiviado 80% tienen un comportamiento directamente proporcionado al tiempo desde su inicio hasta los quince días y no tiende a caer como los medios guillard y lixiviado 30% que después del día trece tienden a bajar su densidad celular.

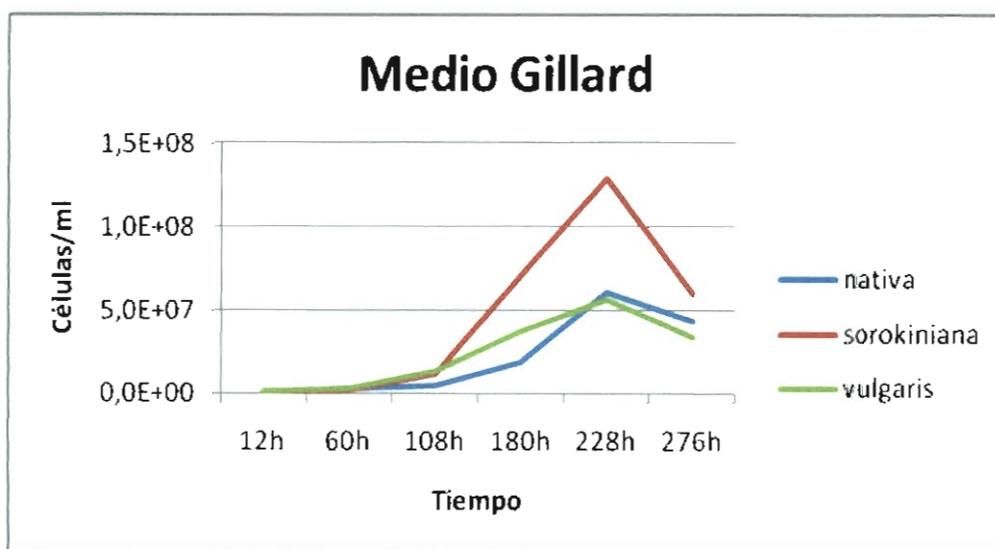
**Curvas de crecimiento de *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella nativa* en medio sueoka, extracto de suelo y lixiviados avícolas.**

**Grafica2. Tiempo versus células de Cepas en medio sueoka**



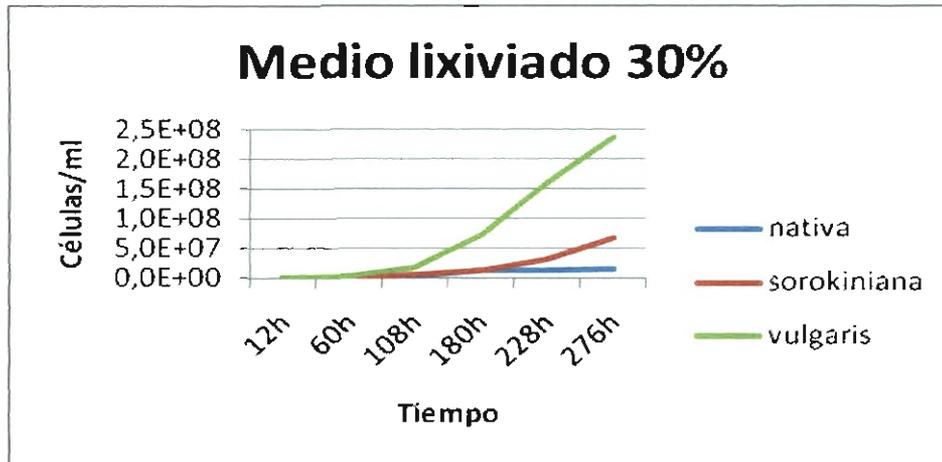
La cepa con mejor comportamiento es *Chlorella vulgaris* en medio sueoka con un número de células/ml de  $2.8E+08$ , el que le sigue fue *Chlorella nativa* con un número de células/ml de  $0.8E+07$  y por ultimo *Chlorella sorokiniana* con un número de células/ml de  $0.7E+07$ .

- Grafica3. Tiempo versus células de Cepas en medio guillard



En el medio gillard la cepa de mejor comportamiento es *Chlorella sorokiniana* con un número de células/ml de  $1,2E+08$  alas 228h seguido por *Chlorella* nativa con un número de células /ml de  $6,0E+07$  alas 228h y por ultimo *Chlorella vulgaris*, vale resaltar que después de este tiempo el crecimiento algal decrece.

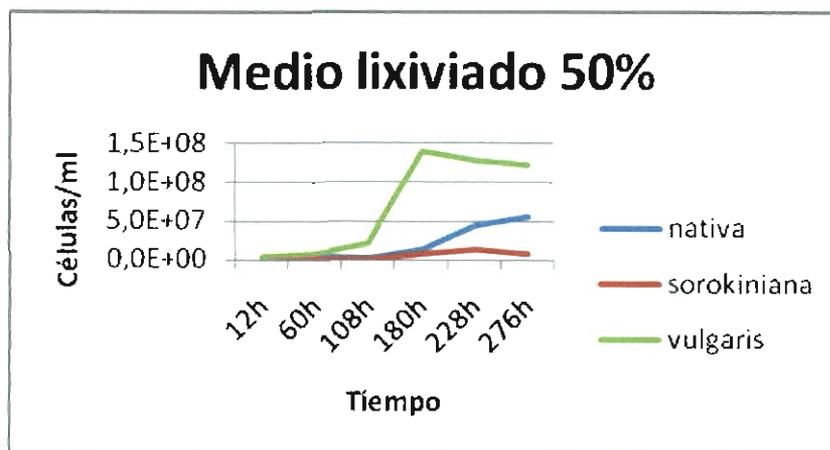
Grafica 4. Tiempo versus células de Cepas en medio lixiviado 30%



En el medio lixiviado 30% la cepa de mejor comportamiento fue *Chlorella vulgaris* con un número de células/ml  $2,4E+08$  en un tiempo de 276h, seguido por la cepa por *Chlorella sorokiniana* con el número de células/ml  $0,7E+07$  y por último fue la cepa *Chlorella* nativa, pero en esta grafica se ve que las cepas tienen un crecimiento directamente proporcionado al tiempo.

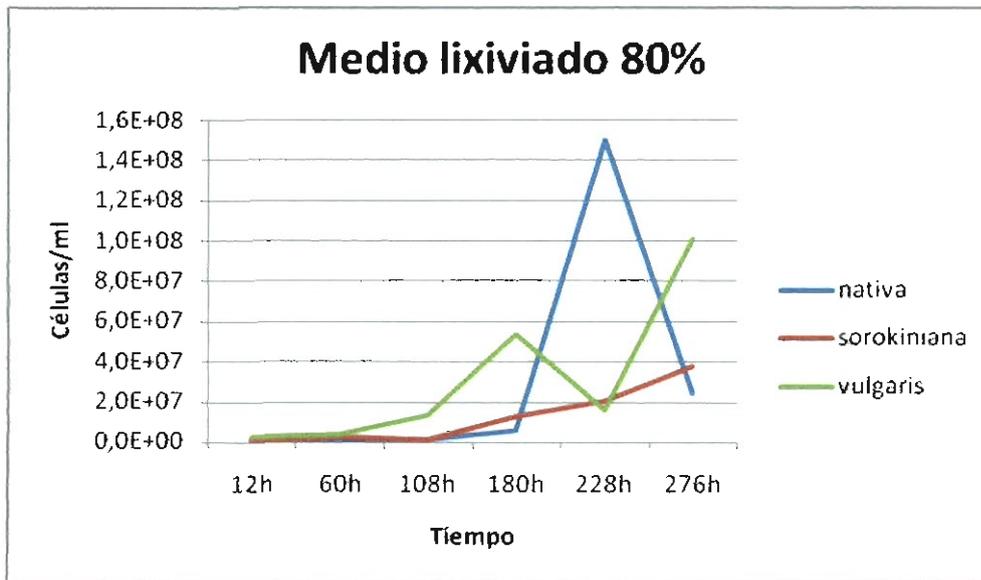
En la grafica se observa una gran diferencia entre los crecimientos de las cepas, esto se debe que la cepa de *Chlorella vulgaris* es menos exigentes en nutrientes que las otras cepas tratadas.

Grafica 5. Tiempo versus células de Cepas en medio lixiviado 50



En el medio lixiviado 50% la cepa de mejor comportamiento fue *Chlorella vulgaris* que tuvo un máximo de crecimiento de  $1,4E+08$  células/ml en 180h aunque después tuvo un crecimiento casi sostenido ya que tiende a bajar su crecimiento la siguiente fue *Chlorella nativa* con un número de células/ml de  $5,0E+07$  y por último *Chlorella sorokiniana* que tuvo un crecimiento relativamente bajo en este medio.

Grafica 6. Tiempo versus células de Cepas en medio lixiviado 80%



Al analizar con ANOVA las concentraciones finales de células por mililitro se encuentra:

El ANOVA muestra un valor  $P=0,022$  que indica una diferencia significativa entre los medios de cultivo y que las cepas divergen entre sí. La prueba de Tukey indica que los mejores medios son: **Sueoka, lixiviado 80% y lixiviado 30%**.

TABLA 2. CRECIMIENTO DE CELULAS A LAS 276 HORAS CON MEDIOS SUEOKA, GUILLARD Y LIXIVIADOS AL 30%, 50% Y 80%.

Medio	Cepa	#cels/ml	DS
Sueoka	Nativa	8,2E+08	5,20E+08
Sueoka	Sorokiniana	7,1E+08	1,20E+08
Sueoka	Vulgaris	2,8E+09	1,60E+08
Guillard	Nativa	4,4E+08	2,20E+08
Guillard	Sorokiniana	6,1E+08	1,30E+08
Guillard	Vulgaris	3,3E+08	1,80E+08
Lixiviado 30%	nativa	1,5E+08	1,50E+08
Lixiviado 30%	Sorokiniana	6,7E+08	4,30E+08
Lixiviado 30%	Vulgaris	2,4E+09	1,60E+09
Lixiviado 50%	nativa	5,6E+08	3,90E+08
Lixiviado 50%	Sorokiniana	7,3E+07	3,20E+07
Lixiviado 50%	Vulgaris	1,2E+09	1,00E+09
Lixiviado 80%	nativa	2,4E+08	2,30E+08
Lixiviado 80%	Sorokiniana	3,8E+08	4,00E+08
Lixiviado 80%	Vulgaris	1,0E+09	3,50E+08

Según los datos obtenido en la tabla 2 las cepas de mayor crecimiento celular fueron: *Chlorella vulgaris* en Sueoka; seguida por *Chlorella nativa* en Sueoka y lixiviado 50%.

## EXPERIMENTO DOS

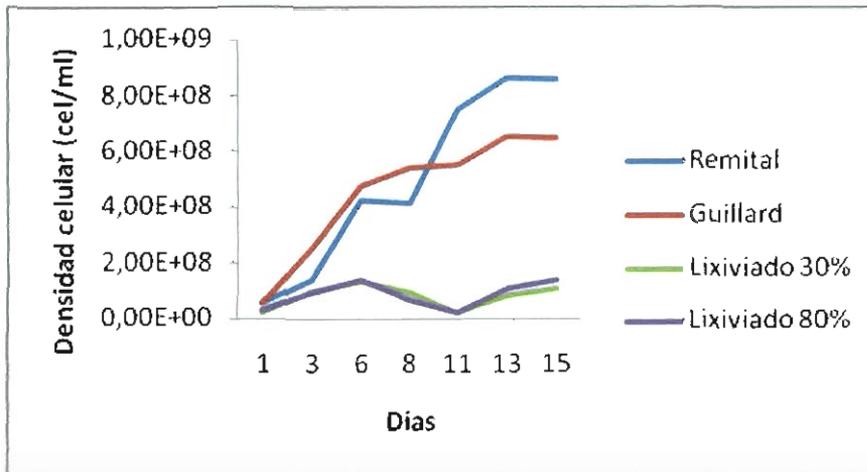
**TABLA 3. CRECIMMIENTO DE CELULAS ALAS 360 HORAS CON TRATAMIENDO REMITAL, GUILLAR Y LIXIVIADO 30%, LIXIVIADO 80%.**

A las 360 h...

<b>Medio</b>	<b>#cels</b>	<b>#cels/ml</b>	<b>DS</b>
Remital	260	1,0E+09	2,40E+08
Remital	138	5,5E+08	2,40E+08
Remital	160	6,4E+08	2,40E+08
Remital	280	1,1E+09	2,40E+08
Remital	240	9,6E+08	2,40E+08
Guillard	113	4,5E+08	2,64E+08
Guillard	93	3,7E+08	2,64E+08
Guillard	148	5,9E+08	2,64E+08
Guillard	209	8,4E+08	2,64E+08
Guillard	250	1,0E+09	2,64E+08
Lixiviado 30%	16	6,4E+07	3,86E+07
Lixiviado 30%	18	7,2E+07	3,86E+07
Lixiviado 30%	20	8,0E+07	3,86E+07
Lixiviado 30%	25	1,0E+08	3,86E+07
Lixiviado 30%	40	1,6E+08	3,86E+07
Lixiviado 80%	35	1,4E+08	5,45E+07
Lixiviado 80%	20	8,0E+07	5,45E+07
Lixiviado 80%	21	8,4E+07	5,45E+07
Lixiviado 80%	45	1,8E+08	5,45E+07
Lixiviado 80%	50	2,0E+08	5,45E+07

Por lo tanto el mejor medio de cultivo para el cultivo de *Chlorella sorokiniana* es el Remital. Con un tiempo de generación (g) de 92 horas y una velocidad de crecimiento  $2,2 \times 10^6$  cel/ml hora.

Grafica 7. Tiempo versus densidad celular del alga *Chlorella sorokiniana* en los medios Remital, guillard, lixiviado 30%, lixiviado 80%.



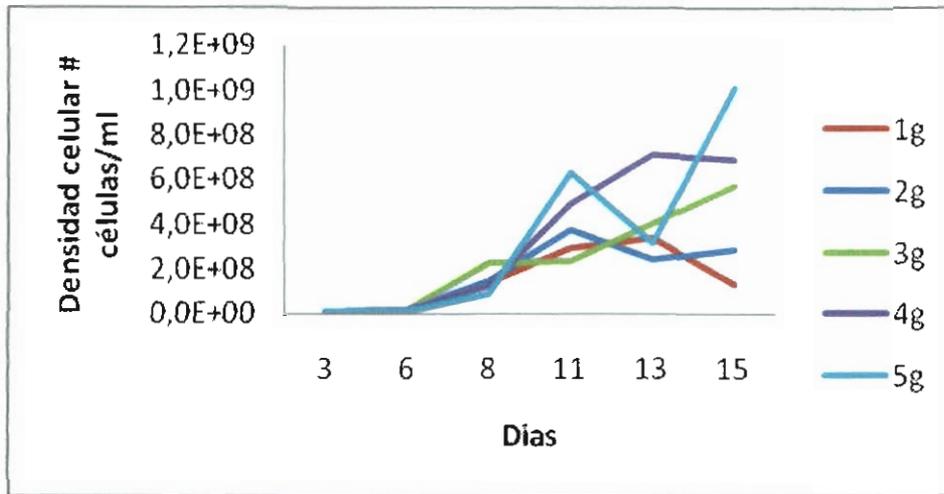
### EXPERIMENTO TRES

Tabla 4. Cultivo de *chorella sorokiniana* con una dosis de 1, 2, 3, 4, 5 gramo por litro de fertilizante Remital.

Cantidad (g)	Desv est abs	error est abs						
1	58	2,30E+08	3,00E+08	5,60E+07	3,20E+07	0,7107	0,18	0,1039
1	80	3,20E+08	3,00E+08	5,60E+07	3,20E+07	0,7107	0,18	0,1039
1	84	3,40E+08	3,00E+08	5,60E+07	3,20E+07	0,7107	0,18	0,1039
2	100	4,00E+08	3,70E+08	2,60E+07	1,50E+07	0,7023	0,2715	0,1567
2	94	3,80E+08	3,70E+08	2,60E+07	1,50E+07	0,7023	0,2715	0,1567
2	87	3,50E+08	3,70E+08	2,60E+07	1,50E+07	0,7023	0,2715	0,1567
3	33	1,30E+08	2,30E+08	1,40E+08	8,20E+07	0,8008	0,2414	0,1394
3	43	1,70E+08	2,30E+08	1,40E+08	8,20E+07	0,8008	0,2414	0,1394
3	99	4,00E+08	2,30E+08	1,40E+08	8,20E+07	0,8008	0,2414	0,1394
4	58	2,30E+08	4,90E+08	2,40E+08	1,40E+08	1,1188	0,4024	0,2323
4	135	5,40E+08	4,90E+08	2,40E+08	1,40E+08	1,1188	0,4024	0,2323
4	174	7,00E+08	4,90E+08	2,40E+08	1,40E+08	1,1188	0,4024	0,2323
5	143	5,70E+08	6,30E+08	8,50E+07	6,00E+07	1,1109	0,1569	0,1109
5	173	6,90E+08	6,30E+08	8,50E+07	6,00E+07	1,1109	0,1569	0,1109

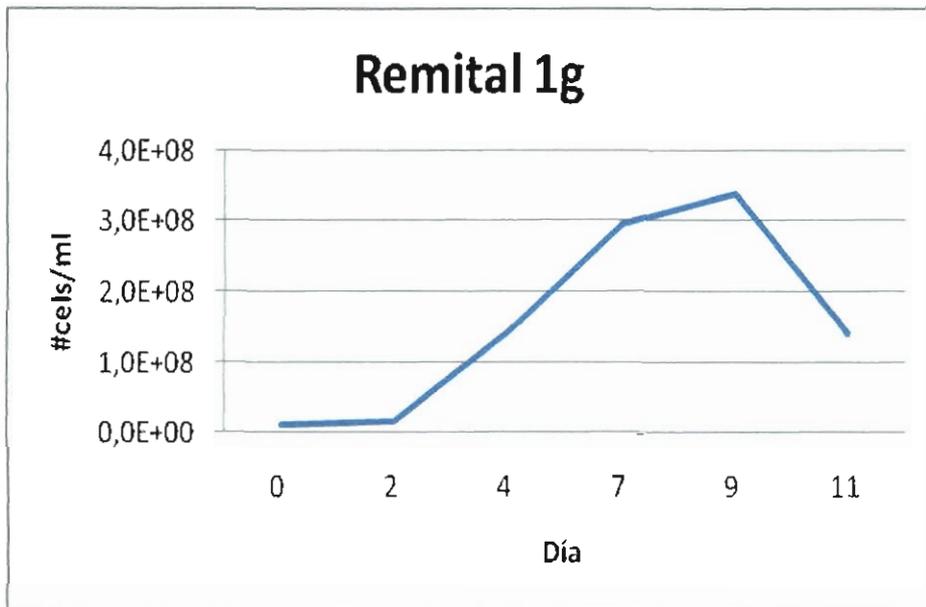
cantidad (g)	No. células contadas	No células /mL	Prom #cels/ml	Desv est	error est	Prom Abs	Desv est abs	error est abs
1	58	2,30E+08	3,00E+08	5,60E+07	3,20E+07	0,7107	0,18	0,1039
1	80	3,20E+08	3,00E+08	5,60E+07	3,20E+07	0,7107	0,18	0,1039
1	84	3,40E+08	3,00E+08	5,60E+07	3,20E+07	0,7107	0,18	0,1039
2	100	4,00E+08	3,70E+08	2,60E+07	1,50E+07	0,7023	0,2715	0,1567
2	94	3,80E+08	3,70E+08	2,60E+07	1,50E+07	0,7023	0,2715	0,1567
2	87	3,50E+08	3,70E+08	2,60E+07	1,50E+07	0,7023	0,2715	0,1567
3	33	1,30E+08	2,30E+08	1,40E+08	8,20E+07	0,8008	0,2414	0,1394
3	43	1,70E+08	2,30E+08	1,40E+08	8,20E+07	0,8008	0,2414	0,1394
3	99	4,00E+08	2,30E+08	1,40E+08	8,20E+07	0,8008	0,2414	0,1394
4	58	2,30E+08	4,90E+08	2,40E+08	1,40E+08	1,1188	0,4024	0,2323
4	135	5,40E+08	4,90E+08	2,40E+08	1,40E+08	1,1188	0,4024	0,2323
4	174	7,00E+08	4,90E+08	2,40E+08	1,40E+08	1,1188	0,4024	0,2323
5	143	5,70E+08	6,30E+08	8,50E+07	6,00E+07	1,1109	0,1569	0,1109
5	173	6,90E+08	6,30E+08	8,50E+07	6,00E+07	1,1109	0,1569	0,1109

**Grafica 8. Diferentes dosis de Remital versus densidad celular**



No hay diferencias significativas entre las diferentes dosis de Remital, es decir que no se requiere aumentar la dosis de Remital para obtener la concentración celular deseada.

**Gráfica 9. *Chlorella sorokiniana* con una dosis de 1 gramo de fertilizante Remital por litro de agua.**



La dosis utilizada y recomendada fue de 1 g de fertilizante Remital /lt de agua con un máximo crecimiento de células de 3,3E+08 cel/ml en 9 días.

## CALCULO DE LA PRODUCTIVIDAD

El Cultivo de *Chlorella sorokiniana* se hizo en tanques de 50lt, 200lt y 500lt con dosis de un gramo de fertilizante Remital por litro de agua. Medición de intensidad lumínica con luxómetro Sper Scientific 850008.

- **Fotobioreactores 3 litros:**

Diámetro: 0,15m; Altura: **0,20m**; Área:  $\pi r^2=0,018m^2$ ; Volumen:  $\pi r^2 h=0,0035m^3$ ;  $1m^3=1000L$

Volumen total de cultivo para fotobioreactor de 3L: 3,5L

- **Los tanques de 50litros:**

Diámetro: 0,24m; Altura: **0,82m**; Área:  $\pi r^2=0,045m^2$ ; Volumen:  $\pi r^2 h=0,037m^3$ ;  $1m^3=1000L$

Volumen total de cultivo para tanques de 50L: 37L x 4=**148L**

Área total de cultivo para tanques de 50L:  $0,045m^2 \times 4=0,18m^2$

- **Los tanques de 250litros:**

Diámetro: 0,46m; Altura: 1,30m; Área:  $\pi r^2= 0,17m^2$ ; Volumen:  $\pi r^2 h=0,22 m^3$

Volumen total de cultivo para tanques de 250L: **220 L por tanque**

Área total de cultivo para tanques de 250L:  $0,17m^2 \times 2=0,34 m^2$

- **Producción obtenida:**

Cultivo	Cosecha obtenida	Rendimiento total	Productividad en 15 días.
1	3,347g/148L	0,02g/L	1,24g/m <sup>2</sup> dia
2	5,739g/148L	0,04g/L	2,12g/m <sup>2</sup> dia
3	7,060 g/148L	0,05g/L	2,61g/m <sup>2</sup> dia
4	24,074g/ 148L	0,16g/L	9g/m <sup>2</sup> dia
5	30,676g/148L	0,21g/L	11,4g/m <sup>2</sup> dia
6	50,460g/1028L	0,05g/L	3,9g/m <sup>2</sup> dia
7	4,610g/148L	0,03g/L	2,56g/m <sup>2</sup> dia
8	29,572g/880L	0,03g/L	11,6g/m <sup>2</sup> dia
9	1,710g/3,5L	0,48g/L	11,9g/m <sup>2</sup> dia
10	21,980g/148L	0,14g/L	8,14g/m <sup>2</sup> dia
11	3,077g/10,5L	0,29g/L	21,4g/m <sup>2</sup> dia
12	24,881g/148L	0,17g/L	9,2g/m <sup>2</sup> dia
13	24,881g/148L	0,17g/L	9,2g/m <sup>2</sup> dia
14	2,040g/10,5L	0,19g/L	14,2g/m <sup>2</sup> dia
15	1,120g/10,5L	0,11g/L	7,8g/m <sup>2</sup> dia
16	2,375g/10,5L	0,22g/L	16,5g/m <sup>2</sup> dia

#### 4. CONCLUSIONES

- Se logro estandarizar un protocolo para la producción del alga *chorella sorokiniana* en diferentes medios.
- Analizando la concentración celular de  $8,5 \times 10^8$  células/ml a los 13 días con iluminación permanente, 25°C y aireación; se determino que el mejor medio de cultivo para la producción de *chlorella sorokiniana* fue el Remita, ya que es menos dispendioso de elaborar y hay un mejor crecimiento del cultivo con respecto a los otros medios.
- El análisis bromatológico de la biomasa nos indica que el porcentaje de lípido presente en las algas de *Chlorella sorokiniana* para producir biodiesel fue de un 3,4% de w/w de lípidos de interés industrial, comparándolos con los datos obtenidos por Chisti, 2007 (14-34% de w/w, ácidos grasos de interés industrial); lo cual nos indica que los lípidos presentes fueron muy bajos y que no es una cepa muy recomendable para la producción de biodiesel.
- Se realizo las curvas de crecimiento de las cepas *chorella vulgaris*, *chlorella* nativa y *chlorella sorokiniana*; se encontró que la de mejor y más rápido crecimiento fue la cepa de *chlorella vulgaris*.
- Las micro algas son organismos que en condiciones adecuadas se desarrollan a gran velocidad y completan su ciclo de vida en un tiempo mucho menor que los cultivos tradicionales.
- Como estudiantes de Agronomía ampliamos, afianzamos y practicamos los conocimientos adquiridos a lo largo de nuestra carrera aplicándolos en el campo científico y aportando al desarrollo de metodologías a nivel experimental.

## 5. BIBLOGRAFIA

- Becker E., 2008, *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge, Cambridge.
- Kemp W., 2006, *Biodiesel: Basics and Beyond*, Aztexpress, Ontario.
- Wehr., sheath,R., 2003, *Freshwater algae of north America: Ecology and classification*, Academic press, San Diego.
- Hurst,C., Garland,J., Mills,A., Grawford,R., Lipson, D., Stetzenbach,L.,2007, *Manual of environmental Microbiology*, 3 edition, Asm press, Washinton.
- Muños M., 2009, *Efectos de diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento y el contenido proteico de Chlorella vulgaris*, Trabajo de grado, universidad Jorge Tadeo lozano, Villavicencio.
- Sawayamal S.,Inoue S., Dote2 Y and Yokoyama S., *co2 fixation and oil production through microalga*.
- Chisti Y.,2007, *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*.

## 6. TABLAS Y ANEXOS

### **Protocolo de cultivo de biomasa de *Chlorella sorokiniana*:**

Para cultivar biomasa de *Chlorella sorokiniana* se debe hacer lo siguiente:

1. Esterilizar en La autoclave un frasco de vidrio de tres litros de capacidad, el cual va hacer utilizado para albergar el medio y las algas.
2. Al frasco estéril adicionar tres litro de agua destilada y por cada litro de agua destilada agregar un gramo de medio Remital, agitar para homogenizar la mezcla.
3. Vierta 300cc del inculo (alga mas medio de cultivo) para los tres litros de agua destilada contenido en el frasco de vidrio estéril.
4. Llevar el frasco al cuarto de incubación para darle las condiciones (luz,aire,temperatura) para que el inculo tenga un desarrollo adecuado; el cuarto debe tener:
  - Temperatura de 18°C.
  - Luz 2840 lux.
  - Se debe proporcionar oxigeno a los frascos mediante mangueras utilizadas en acuarios las cuales deben estar conectada al blower, las mangueras deben ser introducidas hasta tres cuartas partes del recipiente de vidrio y la boca del frasco debe ser tapada con papel aluminio para evitar evapotranspiración y contaminantes del medio.
5. Monitorear crecimiento cada 48 horas utilizando la cámara Neubauer y microscopio.
6. Al pasar quince día después de la siembra, el contenido del frasco toma una coloración verde oscura, es momento de ser llevado a recipientes más grandes de 50 lt.
7. Tres día antes de cumplirse la maduración del medio algal del frasco de tres litros, debe realizarse lo siguiente:
  - 7 a. Utilizar frasco con capacidad de 50 lt estos deben ser lavados muy bien previamente de la siembra.
  - 7b. vierta 50 lt de agua en el recipiente y adicione un gramo de cloro granulado con el fin de purificar el agua, tape el frasco y déjelo actuar durante 24 horas.

7c. pasada las 24 horas, vierta 1 gramo de tiosulfato de sodio para los 50 lt. Proporciónele oxígeno mediante mangueras de acuario las cuales deben estar conectadas al blower con el fin de homogenizar el tiosulfato con el agua, tape el recipiente y déjelo actuar durante otras 24 horas.

7d. luego de las 48 horas de haber tratado el agua ya podemos inocular el recipiente de 50 lt con las algas q teníamos previamente en frascos de tres litros en vidrio.

El frasco de 50 lt debe ser inoculado con 5 lt de inóculo algal, además se le deben adicionar 50 gr de remita como medio nutricional para las algas.

8. Lleve el recipiente al cuarto de incubación para brindarle las condiciones ( temperatura, aire y luz) necesarias para su buen desarrollo:

- temperatura de 22°c
- Luz 2384 lux
- Se debe proporcionar oxígeno a los frascos mediante mangueras utilizadas en acuarios las cuales deben estar conectada al blower, las mangueras deben ser introducidas hasta tres cuartas partes del recipiente de vidrio y la boca del frasco debe ser tapada con papel aluminio para evitar evapotranspiración y contaminantes del medio.

9. Monitorear crecimiento cada 48 horas utilizando la cámara Neubauer y microscopio

10. Al pasar quince días después de la siembra, el contenido del recipiente toma una coloración verde oscura indicándonos que ya puede ser cosechado.

11. Para cosechar se debe suspender el aire del recipiente durante 24 horas de anticipación, luego el contenido del recipiente debe ser pasado por una malla screen de 57µm.

12. Los residuos del fondo del frasco y lo q queda en la malla screen se vierte en un frasco y para adicionarle sulfato de aluminio al 10% es decir 10 ml de sulfato de aluminio por cada tres litro del filtrado, esto se debe dejar actuar durante 48 horas (el sulfato de aluminio es con el fin de aglomerar las algas y por ende se precipiten).

13. Luego pasa por la malla screen y lo que queda en esta dejar secar por convección al ambiente.

### Análisis de varianza por cels/ml1:

Usando texto Adjuntó por SS

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Medio_1	4	6,51088E+16	6,51088E+16	1,62772E+16	3,34	0,022
cepa_1	2	1,13962E+17	1,13962E+17	5,69811E+16	11,69	0,000
Medio_1*cepa_1	8	7,99303E+16	7,99303E+16	9,99128E+15	2,05	0,074
Error	30	1,46285E+17	1,46285E+17	4,87618E+15		
Total	44	4,05287E+17				

S = 69829634 R-Sq = 63,91% R-Sq(adj) = 47,06%

#### ➤ Medio Remital

Detalle	Formula	Cantidad
<b>Nitrógeno Total</b>	(N)	17.0%
<b>Nitrógeno Amoniacal</b>	(N)	9.7%
<b>Nitrógeno Nítrico</b>	(N)	7.3%
<b>Fósforo Asimilable</b>	(P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	6.0%
<b>Potasio Soluble en Agua</b>	(K <sub>2</sub> O)	18.0%
<b>Magnesio</b>	(MgO)	2.0%
<b>Azufre Total</b>	(S)	1.6%
<b>Boro</b>	(B)	0.2%
<b>Zinc</b>	(Zn)	0.1%

#### ➤ Medio guillard

Metales traza	0.5 ml/L de agua destilada.	<b>Se agrega los metales traza, vitaminas, NaNO<sub>3</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O en 1L de agua destilada estéril para ser utilizado finalmente como medio de cultivo.</b>
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O</b>	1ml/ L de agua destilada	
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	1ml/ L de agua destilada.	
<b>VITAMINA</b>	1ml/ L de agua destilada.	

#### ➤ Medio sueoka

<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>8.3Mm</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>5.3Mm</b>
<b>MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.25Mm</b>
<b>CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O</b>	<b>0.133Mm</b>
<b>Trazas hunter</b>	<b>1x</b>
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	<b>9.35Mm</b>

**Trazas hunter 200x**

	1L	500Mm
EDTA Na H <sub>2</sub> O	12.7g	6.35g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.28g	1.14g
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	4.40g	2.20g
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	1.02g	0.51g
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	1.00g	0.5g
CoCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	0.32g	0.16g
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	0.32g	0.16g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>24</sub> -4H <sub>2</sub> O	0.22	0.11g

**ANALISIS BROMATOLOGICO DE BIOMASA ALGAL C. SOROKINIANA**

PARAMETRO	%
Humedad final	0,75
Cenizas	84,91
Extracto etéreo	0,95
Proteína	4,69
Fibra cruda	0
Extracto no nitrogenado (carbohidratos)	8,70
Nutrientes digestibles totales	13,27
Energía bruta	0,62
Energía digestible	0,58
Energía metabolizable	0,48

**ANALISIS BROMATOLOGICO DE LIXIVIADO DE GALLINAZA**

PARAMETRO	%
Humedad final	3,87
Cenizas	35,05
Extracto etéreo	2,36
Proteína	17,97
Fibra cruda	2,09
Extracto no nitrogenado (carbohidratos)	38,66
Nutrientes digestibles totales	51,50
Energía bruta	2,56
Energía digestible	2,27
Energía metabolizable	1,86

## ANALISIS FISICOQUIMICO DE LIXIVIADO DE GALLINAZA

<b>Ph</b>	<b>6,70</b>
<b>Sólidos totales</b>	1116 mg/L
<b>DQO</b>	6800 mg/L
<b>DBO</b>	340 mg/L
<b>Acidez</b>	2774 mgCaCO <sub>3</sub> /L
<b>Alcalinidad</b>	2038 mgCaCO <sub>3</sub> /L
<b>Turbidez</b>	5700 NTU
<b>Potasio</b>	998 mg/L
<b>Sodio</b>	140 mg/L
<b>Dureza cálcica</b>	728 mg/L
<b>Dureza total</b>	910 mg/L
<b>Hierro</b>	20 mg/L
<b>Carbonatos</b>	ND
<b>Bicarbonatos</b>	80 mg CaCO <sub>3</sub> /L
<b>Cloruros</b>	583 mg/L

- Cultivo de *Chlorella sorokiniana* en tanques de 50lt, 200lt y 500lt con dosis de un gramo de fertilizante Remital por litro de agua. Medición de intensidad lumínica con luxómetro Sper Scientific 850008.

Cuarto	Ubicación	Lux	Promedio	Promedio	Error típico	Temperatura °C
1	Luz general	370-540	455			18
	Cepas	2840	2840	2840	100	
2 (50 litros)	Tanque 1 bajo	1800	1683	2629	306	24
	Tanque 1 medio	1300				
	Tanque 1 alto	1950				
	Tanque 2 fondo	1840	3085			
	Tanque 2 bajo	3760				
	Tanque 2 medio	2340				
	Tanque 2 alto	4400				
	Tanque 3 fondo	1700	3078			
	Tanque 3 bajo	4290				
	Tanque 3 medio	2120				
	Tanque 3 alto	4200				
	Tanque 4 fondo	No detectable	1775			
	Tanque 4 bajo	3000				
	Tanque 4 medio	1100				
	Tanque 4 alto	3000				
	Luz general	190	190			

3 (250 litros)	Tanque 1 fondo	2000	2598	1938	455	22
	Tanque 1 bajo	4500				
	Tanque 1 medio	770				
	Tanque 1 alto	3120				
	Tanque 2 fondo	2400	2730			
	Tanque 2 bajo	4190				
	Tanque 2 medio	728				
	Tanque 2 alto	3600				
	Tanque 3 fondo	290	488			
	Tanque 3 bajo	403				
	Tanque 3 medio	583				
	Tanque 3 alto	674				
	Inoculos	2580	3223	3223	766	
		2340				
	4750					
Luz general	583	583				
Exteriores (500 litros)	Tanque 1 fondo	842	881	972	75	27
	Tanque 1 bajo	1230				
	Tanque 1 medio	1250				
	Tanque 1 alto	200				
	Tanque 2 fondo	707	1090			
	Tanque 2 bajo	1200				
	Tanque 2 medio	1250				
	Tanque 2 alto	1204				
	Tanque 3 fondo	890	1074			
	Tanque 3 bajo	1045				
	Tanque 3 medio	1175				

	Tanque 3 alto	1187				
	Tanque 4 fondo	500	843			
	Tanque 4 bajo	850				
	Tanque 4 medio	960				
	Tanque 4 alto	1060				
	Luz general	1310		1310		
Lab Biologia	Luz general	290	290			25
Estante #1	Entrepaño 1 arriba	4100	2578	2578	588	
	Entrepaño 2 cultivo mixto	1500				
	Entrepaño 3 cultivo mixto cepa	2890				
	Entrepaño 4	1820				
Estante #2	Entrepaño 1 arriba	4200	3233	3233	426	
	Entrepaño 2	3200				
	Entrepaño 3	2130				
	Entrepaño 4	3400				

En promedio los tanques de 50Litros tienen 2450 Lux a 24°C; los tanques de 250Litros 1938 Lux a 22°C; los tanques de 500 Litros 972 Lux a 27°C (Temperatura ambiente). Los inoculos se mantienen a 3223 Lux a 22°C. Las cepas se mantienen a 18°C con 2840 lux.

Para cosecha se dejan los tanques 2 a 3 días sin oxígeno para dejar que las algas floculen, luego se recupera la biomasa en frascos de 3 litros, para filtrarlos con malla de 57 $\mu$  y se deja secar a temperatura ambiente protegida de la luz del sol por 4 días. La biomasa seca se congela a -12°C.