

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

Facultad de Química Farmacia



**TRABAJO DE DIPLOMA**

Título: Evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de vinaza.

**AUTORA:**

**Yamilet Peraza Haramboure**

**TUTORES:**

**MSc. Leyanis Rodríguez Rodríguez**

**Dra.C. Liliana María Gómez Luna**

Curso: 2013-2014

“Año 56 de la Revolución”

*Santa Clara*

*“Tan sólo por la educación puede el hombre llegar a ser hombre.  
El hombre no es más que lo que la educación hace de él”.*

*Kant*

## *Dedicatoria*

*A mis padres Martha y Rodolfo por su amor y su apoyo incondicional.*

*A mi otro padre Nelson, al cual quiero mucho y le estoy muy agradecida.*

*A mis queridas hermanas Jessica y Yelennys.*

## *Agradecimientos*

- ✓ *Agradezco a mis padres y abuelos por todo su amor y por impulsarme a tener una buena formación profesional. A mi tío Nelson, por apoyarme y quererme como un padre.*
- ✓ *A mis abuelos que desgraciadamente algunos no están ya presentes, gracias por su ternura.*
- ✓ *También a mis compañeros de aula, gracias por permitirme compartir con ustedes tantas cosas juntos.*
- ✓ *A mis tutoras Leyanis Rodríguez Rodríguez y Liliana María Gómez Luna por su apoyo, profesionalidad y por hacer posible que se realizara esta investigación.*
- ✓ *A los compañeros del Centro de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) de la Universidad de Oriente.*
- ✓ *A todos los profesores del Departamento de Ingeniería Química de la UCLV.*
- ✓ *A todos, muchas gracias.*

## Resumen

Dentro los contaminantes más agresivos de la industria azucarera y sus derivados se encuentran las vinazas de destilería. En este trabajo se presentan los resultados de la evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de vinaza; además de la caracterización físico-química de dicho residual, explicando de forma general el efecto de los componentes de la vinaza, sobre el crecimiento de esta microalga y su contenido clorofila *a*. El empleo de la vinaza como medio de cultivo no solo provee una opción para el aprovechamiento de sus propiedades físico químicas, sino que además, la biomasa de *C. vulgaris* obtenida presenta un alto valor agregado, considerando que entre sus aplicaciones más recientes se encuentra su empleo como fuente renovable de energía en la producción de biocombustibles. Por último se realizó un diseño preliminar de una planta piloto para la obtención de biomasa microalgal, y se evaluó su factibilidad técnica y económica, reportándose pérdidas constituyendo esta planta poco rentable.

Abstact

Inside of the most aggressive pollutants in the sugar industry and their derived are the still vinazas. In this work the results of the evaluation of the growth of *Chlorella vulgaris* are presented in different vinaza concentrations; besides the physical-chemical characterization of having said residual, explaining in a general way the effect of the components of the vinaza, on the growth of this microalge and their contained chlorophyll to. The employment of the vinaza like half of non alone cultivation provides an option for the use of its chemical properties physique, but rather also, the biomass of *C* obtained *vulgaris* presents a high added value, considering that he enters its more recent applications she is its employment as renewable source of energy in the biocombustibles production. Lastly she was carried out a preliminary design of a plant pilot for the obtaining of biomass microalgal, and their technical and economic

## ÍNDICE

<b>Introducción</b>	1
<b>Capítulo 1: Revisión bibliográfica</b>	3
1.1. Aspectos generales de las algas	3
1.2. Clasificación	4
1.3. Microalgas: características generales y sistemas de cultivo	4
1.3.1. Requerimientos principales de los cultivos de microalgas	5
1.3.2. Sistemas extensivos e intensivos de cultivos	6
1.3.2.1. Sistemas extensivos	7
1.3.2.2. Sistemas intensivos	7
1.4. Factores que inciden en el crecimiento microalgal	8
1.4.1. Intensidad de la luz	9
1.4.2. Mezclado	10
1.4.3. Nutrientes	10
1.4.4. pH	11
1.4.5. Temperatura	11
1.4.6. Compuestos tóxicos	12
1.5. Cinética de crecimiento	13
1.6. Fotosíntesis en algas	14
1.7. Propiedades particulares de las microalgas y ventajas de su cultivo	16
1.8. Principales usos de las microalgas	17
1.9. Cultivo sobre residuales	18
1.10. <i>Chlorella vulgaris</i> : cultivo y aplicaciones	19
1.11. Caracterización de la vinaza	20
<b>Capítulo 2: Desarrollo experimental, análisis y discusión de los resultados</b>	20
2.1. Materiales y métodos	20
2.2. Descripción de la especie	20
2.3. Lógica de experimentación	21
2.4. Descripción de los experimentos	22
2.5. Descripción de la vinaza	24
2.6. Condiciones generales de los cultivos en ensayo	26
2.6.1. Ajuste de los parámetros de cultivo	26
2.7. Determinaciones experimentales	27
2.7.1. Determinaciones sobre células en cultivo	28
2.8. Análisis y discusión de los resultados	29
2.8.1. Cultivos estáticos	29
2.8.2. Cultivos aireados	31
<b>Capítulo 3: Diseño preliminar de una planta para el cultivo de biomasa</b>	34
3.1. Diseño preliminar de una planta piloto para la obtención de biomasa microalgal	34
3.2. Selección preliminar del equipamiento	34
3.2.1. Tanques de almacenamiento	34
3.2.2. Estanque	35
3.2.3. Filtro	35
3.3. Balance de materiales	35
3.4. Dimensiones de los equipos	37
3.4.1. Tanques de equipamiento( Un tanque de fondo cónico para la dilución y uno de fondo plano para el almacenamiento de la biomasa)	37
3.4.2. Estanque	38
3.4.3. Filtro	39

3.5. Sistemas auxiliares	39
3.5.1. Sistema de bombeo	39
3.5.2. Sistema de inyección de CO <sub>2</sub>	41
3.6. Análisis económico	42
3.6.1. Estimación del costo total de inversión	42
3.6.2. Costo total de producción	43
3.6.3. Cálculo de la ganancia	45
<b>Conclusiones</b>	46
<b>Recomendaciones</b>	47
<b>Bibliografía</b>	48
<b>Anexos</b>	60

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas constituyen un grupo de organismos unicelulares pertenecientes a sistemas acuáticos o húmedos, los cuales, eventualmente, presentan más diferencias que semejanzas entre sí (Lourenço 2006). Existen registros de cultivos de microalgas realizados hace más de mil años con fines alimenticios en China, México y países del centro-este de África. Sin embargo, la “domesticación” de las microalgas comenzó a mediados del siglo XX (Chen et al. 2009). Actualmente el mercado de las microalgas se basa en la acuicultura, en la producción de biomasa nutritiva para la alimentación y en la producción de compuestos de alto valor agregado, como antioxidantes (Spolaore et al. 2006).

En la última década se registró un aumento de las investigaciones dirigidas al cultivo masivo de microalgas debido a que representan una fuente de biomasa que puede ser empleada en la producción de biocombustibles y biofertilizantes (Xu, Miao et al. 2006, Demirbas 2009). Los combustibles derivados de biomasa vegetal emitirían menos gases de efecto invernadero (GHG) a la atmósfera que los combustibles fósiles. Actualmente las tecnologías asociadas al empleo de microalgas en estos sistemas se encuentran en estado de investigación y desarrollo con el objetivo principal de abaratar su producción, por lo cual la búsqueda de medios de cultivo alternativos para obtener mayor biomasa con un menor costo, se hace imprescindible, en este sentido, *Chlorella vulgaris* parece ser una especie promisoría. Según (Krohn et al. 2010) la “fiebre de las microalgas” se originó por los altos valores de productividad de lípidos por área que algunas especies serían capaces de alcanzar. Sin embargo estas productividades aún no han sido obtenidas y además serían necesarias innovaciones tecnológicas en el sector para que la producción de biodiesel a partir de microalgas represente un proceso viable, tanto en el aspecto económico como en el energético (U.S. DOE 2010).

La vinaza es un residual líquido industrial considerado un desecho, y debido a las grandes cantidades generadas de este material se empezó a investigar en opciones para el aprovechamiento de sus propiedades fisicoquímicas (Santos et al., 2007).

En este trabajo se evalúa la factibilidad del uso de diferentes concentraciones de vinaza como medio alternativo de *C. vulgaris*, con el propósito de establecer cultivos densos para la producción de biomasa.

Por lo que se plantea como **problema científico** que: A pesar del desarrollo y aplicabilidad de los cultivos de microalgas a gran escala, aún se presentan inconvenientes con los costos de producción de la biomasa y su calidad, dependiendo del uso final, lo que está relacionado fundamentalmente con los gastos por concepto de medios de cultivo y energía. En la actualidad ha aumentado el interés por la biomasa de especies como *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis sp* y *Chlorella sp* en la producción de biocombustibles; sin embargo, resulta imprescindible la búsqueda de alternativas viables para reducir al máximo los gastos en medios de cultivo, garantizando una alta concentración de biomasa rica en lípidos, en el menor tiempo posible.

Con el propósito de solucionar el problema anterior se plantea como **hipótesis** del trabajo la siguiente: En dependencia de la concentración, la vinaza permite un crecimiento adecuado de *Chlorella vulgaris*.

Teniendo como objeto el Cultivo de *Chlorella vulgaris* y como campo de acción la variación del crecimiento en relación con diferentes concentraciones de vinaza.

El **objetivo general** de la investigación es:

Evaluar las potencialidades de la vinaza como medio de cultivo para la producción de biomasa de *C. vulgaris*.

Para validar la hipótesis y resolver el problema científico planteado, los **objetivos específicos** del trabajo son:

- Evaluar la variación de parámetros de crecimiento de *C. vulgaris* en relación con el medio de cultivo.
- Comparar parámetros de crecimiento y composición pigmentaria de biomasa de *Chlorella vulgaris* desarrollada en diferentes concentraciones de vinaza y en medio Bristol (control) en cultivos aireados y no aireados.
- Diseñar una planta de obtención de aceite de algas para realizar de forma preliminar la evaluación económica del proceso y determinar los indicadores económicos de rentabilidad.

## Capítulo 1: Revisión Bibliográfica

### 1.1. Aspectos generales de las algas.

El término alga no posee un valor taxonómico formal. Es utilizado para designar a un grupo de organismos con orígenes evolutivos diferentes pero que comparten la capacidad de realizar el proceso de fotosíntesis o que se encuentran relacionados a formas pigmentadas (Barsanti y Gualtieri 2006; Lourenço 2006). Se encuentran como organismos microscópicos solitarios o macroscópicos como organismos multicelulares y como conglomerados de células (Barsanti y Gualtieri 2006).

Se estima que existen entre 1 y 10 millones de especies de algas, de las cuales la mayoría serían microalgas. Este ensamblado de organismos puede ser tanto procariota como eucariota. La gran diversidad del grupo se refleja en el tamaño, tipos de metabolismo, estructura celular, hábitat, organización y morfología celular, pigmentos, polisacáridos estructurales y de reserva y metabolitos específicos (Barsanti y Gualtieri 2006).

### 1.2. Clasificación.

Históricamente los miembros procariotas del grupo de algas se clasificaron en dos divisiones: Cyanophyta y Prochlorophyta, y los miembros eucariotas se agruparon en nueve divisiones: Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Prymnesiophyta (también conocida como Haptophyta), Criptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta y Chlorophyta. (Barsanti y Gualtieri 2006).

En la siguiente tabla se muestra la clasificación de las algas según Barsanti y Gualtieri (2006).

Tabla 1.1. Clasificación de algas.

Reino	División	Clase	
Prokaryota Eubacteria	Cyanophyta	Cyanophyceae	
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae	
	Glaucophyta	Glaucophyceae	
	Rhodophyta	Bangiophyceae	
		Florideophyceae	
	Eukaryota	Heterokontophyta	Chrysophyceae
			Xanthophyceae
			Eustigmatophyceae
			Bacillariophyceae
			Raphidophyceae
		Dictyochophyceae	
Haptophyta		Haptophyceae	
Cryptophyta		Cryptophyceae	
Dinophyta		Dinophyceae	
Euglenophyta		Euglenophyceae	
Chlorarachniophyta	Chlorarachniophyceae		
Chlorophyta		Prasinophyceae	
		Chlorophyceae	
		Ulvophyceae	
		Cladophorophyceae	
		Bryopsidophyceae	
		Zygnematophyceae	
		Trentepohliophyceae	
		Klebsormidiophyceae	
	Charophyceae		
	Dasycladophyceae		

### **1.3. Microalgas: características generales y sistemas de cultivo.**

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos microscópicos que al igual que las plantas contienen clorofilas; son capaces de fijar CO<sub>2</sub> y liberar O<sub>2</sub> a la atmósfera. Existen más de 30 000 especies, muchas de ellas sin estudiar. Las hay de organización procariótica (cianobacterias) y eucariótica. Pueden crecer durante todo el año y presentan un corto ciclo vital; pueden crecer además en diversos ambientes. Algunas son extremófilas en cuanto a temperatura (termofílicas), pH (acidófilas y alcalófilas). Representan las plantas de mayor velocidad de crecimiento de la Tierra; pueden crecer cien veces más rápido que los árboles, tanto que su peso puede llegar a duplicarse diariamente (Serra, 2009).

Hoy es indiscutible la importancia económica de las microalgas, que a diferencia de las plantas superiores, contienen relativamente pequeñas cantidades de material estructural y muchos de los componentes celulares son de reconocido valor económico. Contienen una gran cantidad de pigmentos esenciales que bajo la acción de la luz solar y de sustancias inorgánicas simples como dióxido de carbono, compuestos nitrogenados y fosforados, a través del proceso fotosintético, son transformados en compuestos orgánicos complejos como carbohidratos, lípidos, proteínas, que posteriormente se acumulan en las células y en los tejidos de los organismos simples y superiores. Por el proceso de fotosíntesis también regulan el contenido de oxígeno y dióxido de carbono en la atmósfera, colaborando en el control del efecto invernadero, las lluvias ácidas y el adelgazamiento de la capa de ozono (Travieso y Benítez, 1998).

#### **1.3.1. Requerimientos principales de los cultivos de microalgas.**

Se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas que van desde las fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales. Estas se desarrollan y multiplican en relación a las condiciones fisicoquímicas del medio. En términos generales son los macronutrientes o factores limitantes del crecimiento los que se requieren en cantidades relativamente grandes, mientras que los llamados micronutrientes se necesitan en menores cantidades. En la siguiente tabla 1.2 se exponen los requerimientos principales de los cultivos y los valores aproximados de los parámetros físicos, ya que los requerimientos de nutrientes son particulares de la especie que se vaya a cultivar en las condiciones concretas de cultivo.

Tabla 1.2. Requerimientos principales de los cultivos de microalgas (Kinne, 1979).

	REQUERIMIENTOS	COMPUESTOS QUIMICOS	VALORES
<b>Físicos</b>	Luz		2,000 – 4,000 lux
	Temperatura		15 – 22 °C
	Salinidad		0.37‰
	pH		7 – 9
	Redox		
<b>Nutritivos</b>	C	CO <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	g/100 ml
	O, H	O <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	g/100 ml
	N	N <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> + NO <sub>3</sub>	g/100 ml
	P	PO <sub>4</sub>	g/100 ml
	S	SO <sub>4</sub>	g/100 ml
	Na, K, Ca, Mg	Sales	g/100 ml
	Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	Sales	mg/100 ml
	Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb,	Sales	g/100 ml
	Al, y	Sales	g/100 ml
	Vitaminas	B <sub>12</sub> , tiamina, biotina	g/100 ml

### 1.3.2. Sistemas extensivos e intensivos de cultivo.

De forma general las microalgas pueden ser cultivadas tanto en estanques como en recipientes cerrados, llamados biorreactores o fotobiorreactores como se puede observar en la Figura 1.1. Actualmente, se están investigando los mejores sistemas, debido a que no existe unanimidad de criterios. Los sistemas de cultivos pueden ser de dos tipos: *extensivos* e *intensivos*. (Anexo 1)

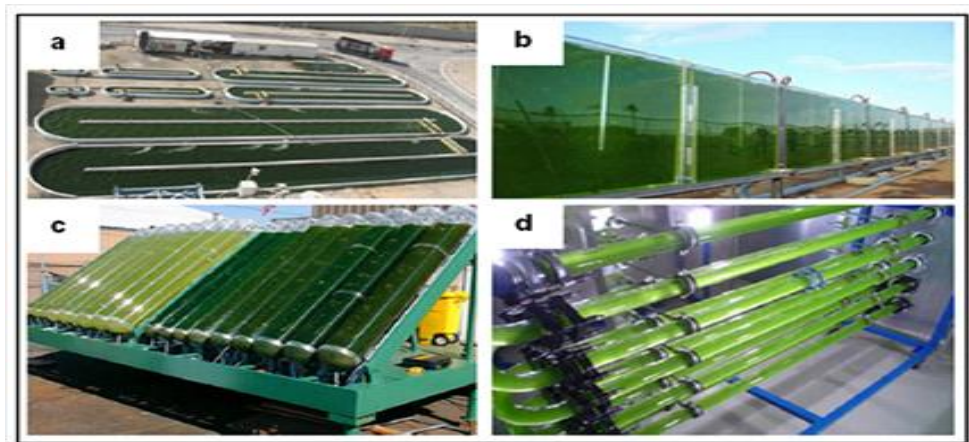


Figura 1. Sistemas utilizados para el cultivo de microalgas: (a) estanque abierto, (b) Fotobiorreactor de placa delgada, (c) Fotobiorreactor tubular inclinado y (d) Fotobiorreactor continuo horizontal.

### **1.3.2.1. Sistemas extensivos.**

El sistema extensivo está basado en el aprovechamiento de la producción natural, donde el control sobre depredadores y competidores es muy limitado o no existe, tampoco sobre los parámetros físico-químicos del agua. El esquema de producción se caracteriza por el uso de extensas áreas para el cultivo, en el cual las actividades fundamentales se limitan a la obtención y confinamiento de organismos a una densidad normalmente baja y conocida.

Ejemplo de ello lo constituyen los estanques en sistemas abiertos que no son más que depósitos artificiales contruidos encima o debajo del nivel del suelo que permiten a las algas mantenerse en movimiento en el medio, de forma que todas reciban la misma cantidad de luz y nutrientes. El riesgo de este tipo de sistemas de cultivos es la alta probabilidad de ser contaminados por otros tipos de algas. En general, para el cultivo en sistemas abiertos se buscan cepas que puedan crecer bajo condiciones en las que a otros organismos les resultaría difícil desarrollarse, como pH, temperaturas y requerimientos nutritivos específicos. Los estanques empleados en el cultivo de microalgas pueden llevar o no removedores de agua. En la actualidad, las investigaciones sugieren el empleo de removedores de agua, con dos finalidades: conseguir que el agua no se quede estancada, ya que esto ocasionaría posibles adherencias de las microalgas a las paredes de los estanques, lo que dificultaría su cosecha e incrementar el intercambio del agua con el oxígeno del aire. Por su parte, la remoción supone un gasto energético y económico que, en algunos casos, puede ser muy elevado. (Calderón, 2012).

Un sistema alternativo para el crecimiento de algas es mediante invernaderos. Aunque se reduce el área de cultivo se solucionan muchos problemas que poseen los sistemas abiertos: menor probabilidad de contaminación por especies no deseadas, pueden cultivarse un mayor número de especies, el período de cultivo es mayor, ya que existe control de la temperatura y puede incrementarse la cantidad de CO<sub>2</sub> en el ambiente, con lo que también aumentaría la tasa de crecimiento de las algas (Europe, 2010).

### **1.3.2.2. Sistemas intensivos.**

Por su parte, el sistema intensivo es el sistema de producción basado en un elevado dominio tecnológico, expresado en el control estricto de la población de cultivo (densidad y talla) y el aprovechamiento óptimo del espacio disponible. Así pues, contempla al mismo tiempo el control estricto de los depredadores y competidores, la calidad del agua y de la alimentación. Es común dentro de este esquema el empleo de sistemas de aireación, filtración, producción

de alimento vivo, desinfección y prevención de enfermedades. Dependiendo del grado de sofisticación, puede incluir la recirculación del agua de cultivo, el uso de organismos mejorados genéticamente, el control automatizado de la calidad del agua y de la alimentación (Gómez 1997).

Los fotobiorreactores son sistemas de cultivo cerrados, los cuales incorporan luz blanca y natural y donde las condiciones son más controladas que en los sistemas abiertos. Un fotobiorreactor es un sistema donde se generan las condiciones necesarias para el desarrollo de la fotosíntesis en los microorganismos, tanto para propósitos de investigación, como para la obtención de biocombustibles alternativos (Europe, 2010). En estos equipos las microalgas no solo reciben la radiación natural, sino que aprovechan también la radiación artificial, siendo esto una gran ventaja frente a los estanques. Sin embargo, ello supone unas instalaciones y unos costos económicos y energéticos adicionales a considerar en la selección de uno u otro sistema de cultivo.

Para lograr altas productividades en el cultivo intensivo se necesita conocer y controlar factores que inciden en el crecimiento microalgal, a continuación se describen algunos de ellos.

#### **1.4. Factores que inciden en el crecimiento microalgal.**

El factor más importante que incide en el cultivo intensivo de microalgas es la radiación solar, sin ella es imposible el crecimiento de las cepas, incluso suministrándoles dióxido de carbono y otras fuentes de carbono para su crecimiento. Similares criterios son asumidos por [(Aiba, 1982), (Becker, 1994)], al expresar que este factor influye en la cinética de la fotosíntesis y que en general los sistemas de cultivos de microalgas están limitados por la luz.

Igualmente (Barsanti y Gualtieri, 2006) señalan, para las algas en general, la influencia del mencionado factor en la velocidad fotosintética y esta a su vez depende de la naturaleza de los nutrientes y del mezclado, así como de factores biológicos como la edad y la especie. Otros factores como el pH, la temperatura y la salinidad son también incidentes. Específicamente en las microalgas, (Kumar et al., 2010) incluyen además otros factores del entorno que afectan el crecimiento como el oxígeno disuelto (OD) y los niveles de elementos tóxicos, como metales pesados. Finalmente, este crecimiento puede ser afectado por condiciones de funcionamiento del reactor como tiempo de residencia hidráulico, transferencia de gas y equipos de mezclado, debido a ello se afecta la disponibilidad de CO<sub>2</sub>, disminuyendo la velocidad de crecimiento y la exposición de luz. Carlsson y Beilen (2007) agregan a los factores biológicos que pueden

limitar las velocidades de crecimiento, el desarrollo de otros microorganismos, que originan la competencia por los constituyentes del sistema.

#### 1.4.1.1. Intensidad de la luz.

La luz constituye un factor fundamental en todo cultivo de microalgas, tanto por sí misma como por sus interrelaciones con otros parámetros. La radiación utilizable fotosintéticamente (PAR) está dentro del rango del espectro visible (400 – 700 nm). Representa la fuente de energía para la fotosíntesis, y tanto la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperíodo (que marca el mecanismo para muchos ritmos cicardianos) afectan al crecimiento y metabolismo microalgal (Lips and Avissar 1986).

Los sistemas de cultivo, principalmente los fotobiorreactores, son optimizados en su geometría para alcanzar la mayor área iluminada posible, lo que resulta que se alcancen mayores tasas de crecimiento y como consecuencia cultivos más densos. Obtener cultivos más densos es el objetivo del proceso donde se desea obtener mayor productividad en biomasa, sin embargo un aumento de la densidad celular puede causar un sombreado, disminuyendo el área iluminada y consecuentemente la tasa específica de crecimiento. Una solución para este problema es el aumento de turbulencia a través de sistemas eficientes de aireación. Un fenómeno muy observado en medios de cultivos techados, que también afecta el crecimiento de las microalgas, es el de fotoinhibición, el cual se puede observar en la Figura 2.

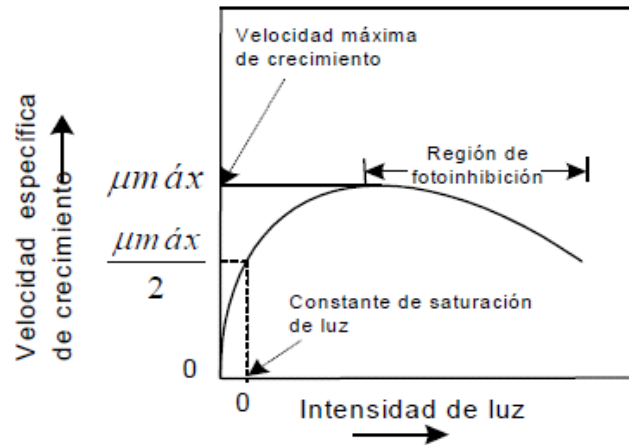


Figura 2. Efecto de la intensidad de luz en la velocidad específica de crecimiento de las microalgas; Chisti (2007).

#### **1.4.1.2. Mezclado.**

El mezclado es necesario para evitar la sedimentación y principalmente para favorecer el intercambio de gas entre las algas y el medio de cultivo. En este sentido, (Becker, 1994) apunta que el mezclado es un parámetro clave para el desarrollo adecuado de las microalgas en bioreactores, ya que bajas velocidades de mezclado obstaculizan la transferencia de masa gaseosa, conducen a la aparición de zonas estancadas, donde la luz y los nutrientes son insuficientes y pudieran prevalecer condiciones anóxicas/anaeróbicas, dando como resultado una disminución de la productividad; así como la viabilidad del cultivo pudiera también estar comprometida por la producción y acumulación de compuestos tóxicos. Contradictoriamente, altas velocidades de mezclado pueden causar cortes perjudiciales a las células según (Carlsson y Beilen, 2007), además de exigir mayor consumo de energía. (Jaouen et al., 1999) reportan los métodos más comunes de mezclado en bioreactores, dentro de ellos se encuentran el bombeo, la agitación mecánica y la inyección de gas. El bombeo, reportado también por (Barsanti y Gualtieri, 2006), ofrece una buena eficiencia de mezclado, pero baja velocidad de transferencia de gas; el estrés hidrodinámico asociado incrementa con la velocidad de rotación de bombeo. Difiere la agitación mecánica con el método anterior en presentar mejor transferencia de gas; sin embargo, este tipo de agitación puede causar un significativo estrés hidrodinámico, lo cual puede ser manejado por medio del uso adecuado de baffles para crear un patrón de turbulencia controlada, según (Kumar et al., 2010) en un estudio más reciente. (Richmond y Cheng-Wu, 2001) señalan que la inyección de gas (burbujeo) produce menor estrés hidrodinámico, mientras mantiene buena transferencia de gas y una aceptable eficiencia de mezclado; por lo que supera a los métodos anteriores. Por este motivo, este método de mezclado debe ser seleccionado para el cultivo intensivo de microalgas. No obstante, (Pulz, 2001) especifica que el daño celular aumenta al aumentar la concentración de biomasa, debido a que son necesarios niveles superiores de agitación de manera exponencial para mantener una alta densidad en el cultivo a un nivel de mezclado predefinido. (Barbosa et al., 2003) sugieren un método para minimizar este problema que consiste en mantener una menor entrada de gas por la boquilla, de manera tal que se reduce el estrés y el consecuente daño a la célula.

#### **1.4.1.3. Nutrientes.**

Dentro de los nutrientes fundamentales que favorecen el desarrollo de la biomasa microalgal se encuentran el carbono, el nitrógeno y el fósforo. Muchos de los medios de cultivo están compuestos por estos nutrientes para lograr un adecuado crecimiento. (Becker, 1994) señala

que al igual que el carbono, el nitrógeno es un elemento importante que se requiere para la nutrición microalgal, por ser un constituyente de los ácidos nucleicos y las proteínas, está directamente asociado con el metabolismo primario de las microalgas. (Green y Durnford, 1996) reportan que para el rápido crecimiento las especies se adaptan mejor al amonio que al nitrato como fuente primaria de nitrógeno. Bajo privación parcial de nitrógeno, éstas crecen a bajas velocidades, pero producen significativamente más lípidos, los cuales son compuestos de reserva sintetizados bajo condiciones de estrés, incluso a expensas de más baja productividad, según (Lardon et al., 2009). (Kumar et al., 2009) señalan que el fósforo es el tercer nutriente más importante para el crecimiento microalgal, y que los fosfatos pueden ser suministrados en exceso debido a que no todos los compuestos fosfóricos son biodisponibles (por ejemplo, los combinados con iones metálicos). En el caso de las microalgas marinas, (Green, 1996) señala, que el agua de mar suplementada con fertilizantes comerciales de nitratos y fosfatos es comúnmente usada para la producción de microalgas. Sin embargo, (Becker, 1994) considera la adición de, metales trazas (Mg, Ca, Mn, Zn, Cu y Mb) y vitaminas, para mejorar los resultados del cultivo.

#### **1.4.1.4. pH.**

El rango de pH para la mayor parte de las especies de algas cultivadas está entre 7 y 9, con el rango óptimo entre 8.2 y 8.7. En el caso de cultivos de alta densidad algal, la adición de CO<sub>2</sub> permite corregir el incremento del pH, el cual puede alcanzar valores límites de pH 9 durante el crecimiento algal (Barsanti y Gualtieri, 2006). Unánimemente, (Kumar et al., 2010) señalan que para algunas especies de microalgas el pH idóneo es el neutro, mientras que para otras es superior. Al unísono, (Hu et al., 1998) reportan el crecimiento de la *Spirulina platensis* a pH 9. Por el contrario, (Kodama et al., 1993), informan un valor menor para la *Chlorococcum littorale*, pH 4. (Kumar et al., 2010) completan que la relación existente entre la concentración de CO<sub>2</sub> y el pH en un bioreactor microalgal, se debe al subyacente equilibrio químico entre tales especies químicas como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. El incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> puede conducir a una mayor productividad de la biomasa, pero puede también disminuir el pH, el cual puede tener un efecto adverso sobre la fisiología microalgal. No obstante, debido al suministro del CO<sub>2</sub> al cultivo de microalgas en estanques abiertos ha provocado un incremento del pH hasta valores entre 10-11 (Oswald, 1988). Este incremento, también señalado por (Barsanti y Gualtieri, 2006) con anterioridad, pudiera llevar a la inhibición del crecimiento.

#### **1.4.1.5. Temperatura.**

La temperatura es un parámetro importante para toda especie; en las microalgas existe una temperatura óptima mediante la cual se logra, junto a factores como intensidad luminosa, pH, concentración de CO<sub>2</sub> y salinidad, altas velocidades de crecimiento. En este sentido, se ha reportado en la literatura rangos óptimos de temperatura. Por ejemplo, (Tamiya, 1957) señala un intervalo de temperaturas óptimas de crecimiento de 15 – 26 °C reportadas para algunas especies, con densidades de células máximas obtenidas a 23 °C. Igualmente, (Barsanti y Gualtieri, 2006) acotan la tolerancia de la mayoría de especies de microalgas entre 16 y 27 °C, aunque estas pueden variar con la composición del medio de cultivo, la especie, y la cepa cultivada. Un valor intermedio de 18 – 20 °C es el más empleado, las temperaturas menores que 16 °C disminuirán el crecimiento, mientras superiores que 35 °C son letales para un número de especies. Además, apuntan que los cultivos deben ser mantenidos a la misma temperatura a la cual fue colectada la especie; organismos polares (<10 °C); templados (10 -25 °C); tropicales (> 20 °C). De acuerdo con estos enfoques, (Muñoz y Guieysse, 2006) plantean que la temperatura, es uno de los factores principales que regula las respuestas celulares tanto, morfológicas como fisiológicas de las microalgas; sin embargo, no precisa un rango óptimo de temperatura como señalan (Barsanti y Gualtieri, 2006). Al igual que estos últimos investigadores (Ono y Cuello, 2003) afirman que las temperaturas óptimas varían entre las especies microalgales; aunque, esta cuantificación también está influenciada por otros parámetros del entorno, tales como la intensidad de luz, explicado con anterioridad.

#### **1.4.1.6. Compuestos tóxicos.**

Existen elementos que pueden ser tóxicos para las microalgas, dentro de ellos se encuentran los metales pesados y varios gases, como O<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>, y NH<sub>3</sub> informan (Yang y Gao, 2003). La literatura reporta mayoritariamente al O<sub>2</sub> como elemento tóxico fundamental para estas especies. Las concentraciones asimilables de CO<sub>2</sub> varían grandemente entre las especies microalgales, como se ha discutido previamente. Comúnmente en agua dulce las microalgas exhiben cambios en las características fotosintéticas cuando crecen a concentraciones de CO<sub>2</sub> alrededor de 5% (v/v). Estos cambios incluyen baja afinidad por el CO<sub>2</sub>, superior sensibilidad fotosintética por el O<sub>2</sub>, superiores puntos de compensación de CO<sub>2</sub>, y baja actividad de anhidrasa carbónica. El efecto de trazas de gases ácidos (NO<sub>x</sub> y SO<sub>x</sub>) en el crecimiento microalgal ha sido determinado usando ambos gases modelos [(Maeda et al., 1995), (Ferreira et al., 1998)] y los gases de combustión real (Matsumoto et al., 1995).

La tolerancia de una cepa de *Chlorella* ante NO<sub>x</sub> y SO<sub>x</sub> ha sido examinada por (Maeda et al., 1995) y han encontrado que la cepa puede crecer bajo la adición de elementos trazas.

Según (Kumar et al., 2010) una causa de baja productividad es la disminución del pH del medio cuando la concentración de SO<sub>2</sub> es alta (> 400 ppm). En contraste, NO a ~300 ppm no influye directamente en el crecimiento microalgal debido a que el NO absorbido por el medio de cultivo es convertido a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, y así puede ser utilizado además como fuente de nitrógeno. La fotosíntesis produce altas concentraciones de oxígeno disuelto; por ejemplo mayores que 35 mg/L pueden inhibir los procesos metabólicos (Carvalho et al., 2006). Además, las microalgas están cargadas negativamente en sus superficies, así pueden adsorber cationes polivalentes con fuerza; esta capacidad de intercambio de iones es la base del potencial microalgal para remover metales pesados en aguas residuales (Muñoz y Guieysse, 2006).

### 1.5. Cinética de crecimiento.

Señalan (Lee et al., 2002) que la velocidad de crecimiento depende de la energía luminosa absorbida por las células. Inicialmente, la velocidad de crecimiento es elevada cuando es usado un inóculo pequeño y cantidades suficientes de nutrientes. Los microorganismos exhiben su máxima velocidad de crecimiento en la fase exponencial mientras no esté limitada la luz. Sin embargo, a medida que aumenta el número de células se incrementa el efecto de "sombra", de este modo decrece la velocidad de crecimiento específica como respuesta a la energía luminosa recibida por unidad de biomasa. Una interesante característica de esta fase descrita por [(Becker, 1994), (Liere y Walsby, 1982)] y citada por (Lee et al., 2002) es que la biomasa total del cultivo se incrementa linealmente con el tiempo, debido a que la producción por unidad de tiempo es proporcional a la absorción de luz. Esta fase de crecimiento lineal en cultivos batch es una característica de los microorganismos fotosintéticos durante el crecimiento fotoautotrófico. Así, el conocimiento de los factores determinantes a partir de la velocidad de crecimiento lineal puede suministrar una estrategia para optimizar la productividad del cultivo algal. Han sido propuestos varios modelos para la cinética de crecimiento microalgal en cultivos batch y continuos [(Lee et al., 1987), (Lehana, 1990), (Molina et al., 1994), (Ryland et al., 2000)]. Un modelo monodimensional fue propuesto por (Lee et al., 2002) para calcular la velocidad de crecimiento lineal de microorganismos fotosintéticos en fotobiorreactores de panel plano durante cultivación a batch, expresado por la Ecuación 1.1:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{k \cdot \mu_m}{\alpha \cdot L} \cdot \log(I_0 \cdot I_s^{(\varepsilon-1)}) \cdot I_c^{-\varepsilon} \quad 1.1$$

donde  $K$  y  $I_0$  son parámetros de operación,  $\mu_m$ ,  $\hat{\mu}$ ,  $\hat{\mu}_s$ ,  $I_s$ , e  $I_c$  son propiedades inherentes de la cepa, y  $L$  representa la geometría del fotobiorreactor. El mismo se derivó de una combinación del fenómeno de atenuación de luz y de la curva respuesta de luz basada en la ley de Lambert-Beer y la ecuación de Monod, respectivamente. La ley de Lambert-Beer es un simple modelo utilizado para calcular la absorción de luz y la profundidad de penetración, representada por la Ecuación 1.2:

$$\text{Log} \left( \frac{I_0}{I} \right) = \alpha \cdot X \cdot x \quad 1.2$$

donde  $I_0$ ,  $I$ ,  $\alpha$ ,  $X$ , y  $x$  denotan la intensidad de luz incidente, la intensidad de luz a una profundidad  $x$ , el coeficiente de absorción de luz específico, la concentración celular, y la distancia de la superficie iluminada, respectivamente.

### 1.6. Fotosíntesis en algas.

La fotosíntesis es el proceso más importante en el metabolismo de las algas. Estas utilizan la energía solar para metabolizar el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) a metanal ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) liberando oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ). Las moléculas de  $\text{CH}_2\text{O}$  constituyen los bloques responsables de la formación de moléculas de glucosa en las microalgas. La Ecuación 1.3 describe el proceso universal de la fotosíntesis.



En este proceso de fotosíntesis el  $\text{CO}_2$  se metaboliza a compuestos orgánicos como azúcares utilizando la energía solar. La Ecuación 1.4 representa este proceso de manera general.



De acuerdo con la Figura 3 la luz es primeramente absorbida por la antena de pigmentos del fotosistema (PS) I y II. La energía absorbida es transferida al centro de reacción de clorofilas: P680 en el fotosistema II y P700 en el fotosistema I. La absorción de un fotón de luz por el fotosistema II remueve un electrón del P680. Con la carga positiva resultante, el P680 es lo suficientemente electronegativo para remover un electrón de una molécula de agua. Cuando estos pasos ocurren cuatro veces, requieren de dos moléculas de agua, una molécula de oxígeno y cuatro protones ( $\text{H}^+$ ) los cuales son liberados. Los electrones son transferidos a través de la plastoquinona al complejo citocromo b/f (Pq y Cit b/f en la Figura 3) donde se proporciona la energía para la quimiosíntesis. La activación del P700 en el fotosistema I permite recoger los electrones del complejo citocromo b6/f (PC en la Figura 3) elevándolo a un

alto potencial redox que, después de pasar por la ferredoxina, es capaz de reducir el  $\text{NADP}^+$  a  $\text{NADPH}$  produciendo energía (Martin, 2010).

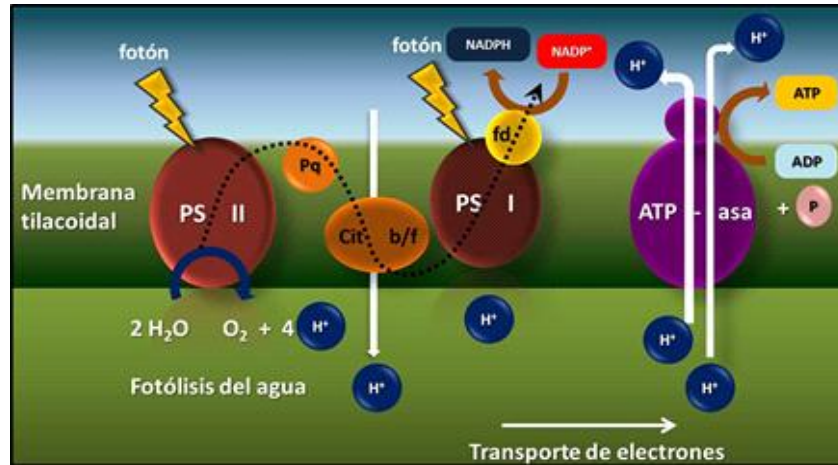


Figura 3. Diagrama esquemático de la fotosíntesis (Martin, 2010).

### 1.7. Propiedades particulares de las microalgas y ventajas de su cultivo.

La biomasa microalgal está constituida aproximadamente por 20 - 30% de lípidos, de 40 - 50% de proteínas y el resto son carbohidratos, que en algunas especies pueden llegar hasta el 55% de la biomasa, y otros compuestos de importancia menor (Borowitzka 1988, Benemann et al. 1998; Spolaore et al, 2006). Se constituyen así en el producto del más eficiente estado de producción de biomasa en el ciclo de la naturaleza, siendo reconocidas como un excelente recurso medioambiental y biotecnológico.

En contraste a la mayoría de las bacterias y el total de los hongos y levaduras, las microalgas por su capacidad fotosintética pueden alcanzar grandes rendimientos solamente con energía solar adecuada y una fuente de carbono como el  $\text{CO}_2$  o bicarbonatos, además de nutrientes de fácil disponibilidad (Olguín, 1984; Apt y Behrens, 1999).

Algunas especies son capaces de crecer sobre sustrato orgánico, en presencia o ausencia de luz (Travieso y Benítez, 1998; Apt y Behrens, 1999; Miao y Wu, 2006). La capacidad de estos microorganismos de poder crecer en ambientes diferentes y adversos a muchos otros organismos vegetales, se debe a la variedad excepcional de lípidos y de otros compuestos inusuales, que están en condiciones de sintetizar (Guschina y Hardwood, 2006).

Entre los distintos grupos de organismos fotosintéticos, las microalgas resultan ser uno de los más eficientes en utilizar la energía solar. Por lo general, las plantas superiores presentan una

eficiencia fotosintética alrededor del 2% o menos. Las microalgas, gracias a su simplicidad estructural, tienen una eficiencia fotosintética superior y según las condiciones ambientales y de cultivo, pueden alcanzar hasta 4 - 8%. Así por ejemplo, se tienen estimaciones de productividades tan altas como 60 – 80 t de peso seco / ha/ año; en contraste con cultivos convencionales que producen entre 10 - 30 t/año (Olguín, 1984; Kojima y Lee, 2001; Salazar González, 2006). Esta característica las hace extremadamente productivas.

Las microalgas son convertidores mucho más eficientes de la energía solar que cualquier planta terrestre conocida, porque crecen en la suspensión donde tienen el acceso ilimitado al agua y acceso más eficiente al CO<sub>2</sub> y a los nutrientes (Salazar González, 2006)

De importancia particular es que las microalgas pueden ser cultivadas todo el año, y cosechadas continuamente.

Pueden crecer en tierras marginales en las regiones áridas del mundo, en ambientes salinos e hipersalinos de baja calidad o en aguas residuales cargadas de nutrientes, que no son buenas para la irrigación agrícola o el consumo para los seres humanos o los animales (Derner y col. 2006) y los cultivos de esa manera no compiten con la agricultura tradicional por cantidad o calidad de suelos (Thomas, 1983; Ciferri y Tiboni, 1985; Hall, 1986; Richmond, 1986c). Los cultivos algales también tienen un consumo de agua más bajo que la cantidad requerida por los cultivos tradicionales (Heussler, y col., 1978c; Vieira Costa, 2004). Si uno considera que el agua usada se puede utilizar luego para la irrigación, los cultivos algales son aún más ventajosos.

Las microalgas crecen al igual que las bacterias, es decir, de manera exponencial. Es un crecimiento muy rápido, ningún vegetal terrestre da un crecimiento de ese tipo. Las plantas necesitan un tiempo más prolongado. (Derner y col. 2006).

Por ser organismos unicelulares, su biomasa entera posee los productos de interés, a diferencia de las plantas superiores en las que los productos recuperables se encuentran en sitios u órganos específicos, lo que dificulta su extracción. Debido a esto, la inducción fisiológica para la producción de compuestos de interés comercial como proteínas, lípidos, glicerol, pigmentos, enzimas y biopolímeros es fácilmente realizable (Cohen, 1993; Richmond, 1986; Romero y col. 2001; Romero y Otero, 2004; Derner y col. 2006).

Otra ventaja que tienen las microalgas es que su cultivo no requiere el uso de los pesticidas y herbicidas que deben usarse con los vegetales terrestres para alejar plagas (Vieira Costa, 2004). Reconociendo estas valiosas propiedades, se iniciaron diferentes líneas en el campo de la investigación aplicada de microalgas, desde la década del 40 y que estuvieron influenciadas por factores socioeconómicos de cada época.

### **1.8. Principales usos de las microalgas.**

La biomasa proveniente de algas (Figura 4) se ha empleado históricamente como fertilizante y como fuente de alimento tanto para animales como para humanos. Las microalgas también son empleadas en algunos procesos de la ingeniería ambiental como el tratamiento biológico de efluentes y la bio-remediación. Algunas especies producen compuestos químicos muy útiles como aminoácidos, vitaminas, carotenoides, ácidos grasos, polisacáridos y antibióticos. Los avances técnicos y biotecnológicos han permitido, y permitirán aún más en el futuro, el empleo de las microalgas en áreas tan diversas como la alimentación, la industria cosmética, la industria farmacéutica (descubrimiento de metabolitos secundarios con potencialidad farmacológica), la agricultura, la acuicultura y la remediación del medio ambiente (Richmond, 2004). En cuanto a su aplicación energética, son utilizadas como materia prima para la producción de biodiesel, biometano (Spolaore, 2006), biohidrógeno (Melis, 2002) y bioetanol (Greenwell, H et al., 2010).

En la actualidad la biomasa algal se utiliza en aplicaciones varias, dada la propia versatilidad de las microalgas y su diversidad. Destacan las siguientes aplicaciones:

- Agropecuarias: Mejoran la producción vegetal como abono y fertilizante y sirven como complemento alimenticio del ganado.
- Alimenticias: Forman parte de la tradición gastronómica de China, Japón y Corea, especialmente la especie *Porphyra*, por sus propiedades nutritivas y organolépticas (olor y sabor). En la "poliacuicultura ecológica", las algas sirven de complemento dietético para peces o moluscos de granjas de cultivo.
- Farmacológicas: Muy utilizadas en la medicina tradicional oriental, actualmente se están empleando para combatir un número de afecciones y enfermedades cada vez mayor, gracias a su poder gelificante, antitumoral, antioxidante, anti-úlceras, anticolesterol, entre otras.
- Cosméticas: Los extractos de algas se emplean en todo tipo de productos para el tratamiento de uñas rotas, acné, arrugas, seborrea, e incluso para la caída del cabello, el rejuvenecimiento de la piel, la obesidad o la celulitis. Asimismo, su capacidad fotoprotectora se está utilizando para el desarrollo de cremas solares
- Medioambientales y energéticas: Como restauradoras de zonas contaminadas, depuradoras de efluentes o como bio-indicadores para conocer el estado de un ecosistema. Asimismo, su uso como combustible, para generar bioetanol (metano), hidrógeno o biodiesel es otra línea

fructífera de investigación (Anexo 2). También contribuyen a la reducción de la concentración de dióxido de carbono atmosférico, mediante la reducción de las emisiones y/o la absorción del dióxido de carbono producido en exceso, conocido como “secuestro de carbono”. La utilización de microorganismos fotosintéticos con capacidad de absorber CO<sub>2</sub> de la atmósfera, podría ser una alternativa de reforestación. Las microalgas, por ejemplo, son las principales responsables por la absorción biológica de CO<sub>2</sub> atmosférico en océanos que cubren las ¾ partes de la superficie del globo terrestre. Este proceso, juntamente con la difusión directa de CO<sub>2</sub> en el agua impide la acumulación de gases de efecto invernadero.



Figura 4. Biomasa algal concentrada(a) y seca (b).

### **1.9. Cultivo sobre residuales.**

El cultivo de microalgas sobre residuales permite el aprovechamiento y la transformación de los nutrientes inorgánicos contenidos en estas aguas para favorecer el crecimiento de las mismas, funcionando este como medio de cultivo abaratando los costos de producción de la biomasa, con la consecuente producción de oxígeno, para mejorar la calidad del efluente, llevando a cabo una eficiente bioconversión de la energía solar, en la utilización y eliminación de materia orgánica, con el doble efecto de la biorremediación.

### **1.10. *Chlorella vulgaris*: cultivo y aplicaciones.**

Rodolfi y colaboradores (2010) estudiaron alrededor de 30 cepas de microalgas para elegir la mejor productora de lípidos y el género *Nannochloropsis* junto con *Isocrysis* resultó como uno de los mejores candidatos para la producción de aceite de algas (García Molina et al. 2001). Varios investigadores, en cambio, se han centrado en *Chlorella* sp. (Moser 2004, Miao and Wu 2006) que parece ser una buena opción para la producción de biodiesel puesto que aunque existen otras especies tan productivas como esta, posee una gran capacidad para crecer en diversos sustratos así como una gran adaptabilidad a disímiles condiciones ambientales, otros

factores a tener en cuenta a la hora de seleccionar una cepa como candidata para la producción de biodiesel (Montero-Sánchez, Gallo et al. 2013).

En un estudio sobre la productividad de lípidos en cinco especies de microalgas, Montero Sánchez (2013) explica que tres de las microalgas en estudio, *Nannochloris sp.*, *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* se presentan como posibles fuentes de lípidos para la industria (Tabla 1.3.) al presentar contenidos lipídicos de 51, 29 y 28%, respectivamente, valores que concuerdan con los referidos por Mata y colaboradores (2010) (Mata, Martins et al. 2009). (Anexo 3)

Tabla 1.3. Contenido de aceite y productividad de las microalgas reportados por (Montero-Sánchez, Gallo et al. 2013).

	<b>Especie de microalgas</b>	<b>Por ciento de lípidos</b>	<b>Productividad de lípidos (mgL<sup>-1</sup>d<sup>-2</sup>)</b>	<b>Productividad de biomasa (gL<sup>-1</sup>d<sup>-2</sup>)</b>
1	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	15.3	2.40	0.020
2	<i>Nannochloris sp.</i>	51.0	1.46	0.003
3	<i>Dunaliella salina</i>	29.2	5.42	0.020
4	<i>Chlorella vulgaris</i>	27.8	42.49	0.150
5	<i>Haematococcus pluvialis</i>	13.4	11.96	0.090

La biomasa resultante de los cultivos de *Chlorella sp* específicamente; cultivada en condiciones mixotróficas a cielo abierto y con residuales puede usarse como suplemento vitamínico idóneo para la alimentación animal, ya que contiene elevadas concentraciones de tiamina, riboflavina, biotina y ácido nicotínico (Quintana et al., 1999). También se propone para el consumo humano la biomasa crecida sobre residuales de destilerías de aceite de palma por su concentración de proteínas, minerales, ácidos grasos y bajo contenido de colesterol (Sivalingam, 1983).

En general esta biomasa es apta para el alimento animal y en algunos casos para el consumo humano, y por último y no menos importante para la producción de biocombustibles y biofertilizantes.

### **1.11. Caracterización de la vinaza.**

La vinaza es un residuo industrial del proceso de la destilación alcohólica que posee características propias, que lo convierten en un agente muy contaminante del medio ambiente, incrementan la temperatura del cuerpo receptor de agua cuando son vertidas y disminuyen la

cantidad de oxígeno disuelto disponible, cuando no son neutralizadas puede disolver algunos metales. Esta contiene todos los componentes del mosto que han sido arrastrados por el vapor de agua así como cantidades de azúcar residual y componentes volátiles, además posee materia orgánica abundante que incluye una cantidad considerable de fenoles y sus polímeros, los cuales son difíciles de degradar biológicamente y poseen propiedades antimicrobianas y fitotóxicas que impiden el tratamiento eficiente por degradación microbológica, especialmente aerobia (Cobos, 2007).

De manera general los constituyentes de las vinazas son los siguientes:

- Sustancias inorgánicas solubles en las cuales predominan los iones K, Ca y SO<sub>4</sub>.
- Células muertas de levadura.
- Sustancias orgánicas resultantes de los procesos metabólicos de levaduras y microorganismos contaminantes.
- Alcohol y azúcar residual.
- Sustancias orgánicas insolubles.
- Sustancias orgánicas volátiles. (García y Rojas, 2006).

Su composición depende de las características de la materia prima usada en la producción de alcohol, del sustrato empleado en la fermentación, del tipo y eficiencia de la fermentación y destilación.

## Capítulo 2: Desarrollo experimental y análisis de resultados.

### 2.1. Materiales y Métodos.

Se realizó un estudio exploratorio descriptivo para evaluar la factibilidad del uso de la vinaza a diferentes concentraciones para el cultivo de *Chlorella vulgaris*. Este fue desarrollado en los Laboratorios de Ecotoxicología del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) de la Universidad de Oriente.

### 2.2. Descripción de la especie.

La cepa utilizada fue aislada del medio local, específicamente de un estanque dedicado al cultivo de ciprínidos en la estación de acuicultura de Maffo, Contramaestre, y mantenida en el cepario del Laboratorio de Ecotoxicología del CNEA (Figura 2.1) con el código F010102-A, donde se conserva en condiciones adecuadas desde el 2002, año en que fue aislada, tanto en el Banco Maestro como en el Banco de Trabajo, en medio Bristol sólido y líquido.

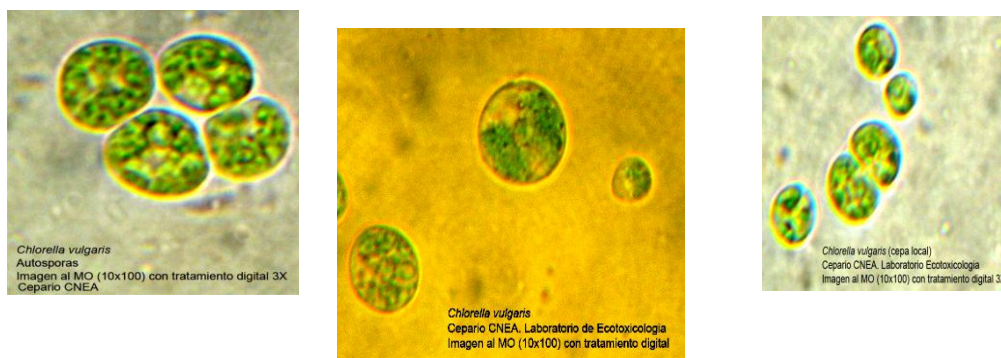


Figura 2.1. Imágenes de *Chlorella vulgaris*. Cepario del Laboratorio de Ecotoxicología del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA).

Para su clasificación se utilizaron las claves dicotómicas tradicionales y se siguieron los criterios de varios autores (Sant'Anna 1984, Van den Hoek, Mann et al. 1995). Además, se consultaron expertos en Cuba y Japón, y las bases de datos ALGATERRA y NIES (NIES 2001, AlgaTerra 2002). La cepa fue depositada en el cepario de la Empresa Genix, del Ministerio de la Agricultura, en Ciudad de La Habana.

El género *Chlorella* pertenece a la clase Trebouxiophyceae (NIES 2001); orden Chlorococcales (Chlorellales según Kowwets) (Van den Hoek, Mann et al. 1995) familia Oocystaceae (Bourrelly

1990). *Chlorella vulgaris* es un alga verde unicelular de agua dulce; las células se presentan aisladas aunque eventualmente pueden formar agregados; tiene forma esférica y un tamaño que oscila entre 2 y 6  $\mu\text{m}$ . Cada célula posee un pirenoide y un cloroplasto parietal único en forma de copa, con abertura irregular, que ocupa gran parte del volumen celular (Sant'Anna 1984). Se reproduce solamente por autósporas (Van den Hoek, Mann et al. 1995). Presentan una pared celular celulósica rígida que dificulta su digestibilidad por animales monogástricos (Becker 1994); esta es fina, lisa y está compuesta fundamentalmente por esporopolenina (Van den Hoek, Mann et al. 1995), que es un politerpeno resistente a la degradación (Soeder and Hegewald 1988). Las especies del género tienen marcadas diferencias en cuanto al comportamiento ante factores como la salinidad, acidez y elevadas temperaturas (Kessler 1986), aunque de forma general, toleran amplios intervalos de salinidad y de pH (Oh-Hama and Miyachi 1988). La mayoría de las especies del género crecen con gran facilidad, lo que favorece el desarrollo de sus cultivos; debido a esto frecuentemente se utilizan como modelo biológico en investigaciones fisiológicas y bioquímicas (Van den Hoek, Mann et al. 1995). Esta microalga es una de las especies más abundantes y frecuentes en la flora de las aguas residuales y lagunas de oxidación (Lincoln and Earle 1990); crece rápidamente a elevadas temperaturas y tolera hasta 37 °C en condiciones de cultivo a cielo abierto.

### **2.3. Lógica de experimentación.**

Se establecen cultivos en un cuarto acondicionado utilizando mezclas de vinaza residual previamente caracterizada y medio Bristol, el cual además se utiliza sólo como medio control en condiciones experimentales generales (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Condiciones experimentales para el cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre vinaza y medio Bristol. No aireados y aireados.

<b>NO AIREADOS</b>	<b>Control Bristol</b>	<b>Vinaza 100 mL</b>	<b>Vinaza 50 mL</b>	<b>Vinaza 25 mL</b>	<b>Vinaza 12.5 mL</b>
<b>Volumen de cultivo (mL)</b>	150	150	150	150	150
<b>Temperatura (°C)</b>	20± 2°	20± 2°	20± 2°	20± 2°	20± 2°
<b>Concentración inicial (*10<sup>4</sup> cél/mL<sup>-1</sup>)</b>	19.25	26.77	15.9	32.02	22.4

<b>Intensidad de la luz (<math>\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}</math>)</b>	75	75	75	75	75
<b>pH</b>	7	7	7	7	7
<b>AIREADOS</b>	<b>Control Bristol</b>	<b>Vinaza 100 mL</b>	<b>Vinaza 50 mL</b>		
<b>Volumen de cultivo (mL)</b>	250	250	250		
<b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	$20 \pm 2^{\circ}$	$20 \pm 2^{\circ}$	$20 \pm 2^{\circ}$		
<b>Concentración inicial (<math>*10^4 \text{cél/mL}^{-1}</math>)</b>	17	18	14		
<b>Intensidad de la luz (<math>\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}</math>)</b>	58.59	58.59	58.59		
<b>pH</b>	7	7	7		

Se establecen cultivos estáticos simulando las condiciones de lagunas de oxidación, sin consumo de energía para el mezclado, para el ensayo de diferentes concentraciones de vinaza. Además se desarrollan cultivos aireados para el desarrollo de la cinética de crecimiento bajo condiciones de luz continua durante 15 días.

#### **2.4. Descripción de los experimentos.**

Se establecen cultivos continuos de 250 y 150 mL a partir del inóculo en frascos de vidrio cilíndricos de 250 y 150 mL. Para el desarrollo de los mismos se utilizó vinaza procedente de la destilería Heriberto Duquesne, la misma fue decantada y filtrada para eliminar residuos sólidos sedimentables e impurezas y se esterilizan en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

Experimento 1: Se establecen cultivos no aireados de 150 mL (1, 2, 3, 4, 5) con 0, 12.5, 25, 50 y 100 mL de vinaza respectivamente.

Experimento 2: Se establecen cultivos aireados de 250 mL (A, B, C, D) y al cabo de los cinco días son restituidos los mismos. Los medios A y C son restituidos con 100 mL medio Bristol, mientras que los medios B y D son restituidos con 100 mL y 50 mL de vinaza respectivamente.

Caracterización físico-química de los medios de ensayo:

Los medios artificiales se usan principalmente para fines experimentales, aunque existen algunas especies que no crecen en medios artificiales por factores desconocidos ya que se ve afectado su crecimiento.

Las principales fórmulas utilizadas van desde el agua de Miguel, que data de 1910, desarrollada por Allen-Nelson; el medio de End-Schereiber de 1934, hasta fórmulas específicas para familias como la fórmula del Laboratorio Haskins de Nueva York para diatomeas.

En términos generales son los macro-nutrientes o factores limitantes del crecimiento, el carbono, nitrógeno, fósforo, silicio, magnesio, potasio y calcio, que se requieren en cantidades relativamente grandes, mientras que los llamados micronutrientes (Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc, Sodio, Molibdeno, Cloro y Cobalto) se necesitan en menores cantidades (Paoli Li Alfaro 2010).

El medio utilizado para el mantenimiento y desarrollo de estos cultivos fue el sugerido por Bristol (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Formulación del medio Bristol. Fuente: (Gómez 1997).

<b>Macroelementos</b>		<b>Oligoelementos</b>
	(g L <sup>-1</sup> )	
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	1.000	Solución algal (8.3 g L <sup>-1</sup> )
<b>CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O</b>	0.025	(EDTA 39.80% + Fe 10.20% + Zn 0.53% + Mn <b>0.44%</b>
<b>MgSO<sub>4</sub>.x 7H<sub>2</sub>O</b>	0.075	+ Mo 0.56% + Co 0.46% + Cu 0.49% + <b>Tiamina 0.162%</b>
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.075	+ Biotina + Cianocobalamina 0.008%
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.175	+ Excipiente Vitamínico 0.390%)
<b>NaCl</b>	0.025	

Se utiliza el nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>) como fuente de nitrógeno. La disolución de oligoelementos se esterilizó a 121 °C durante 15 min, por separado de los macroelementos. La disolución de oligoelementos se prepara a partir de la formulación comercial Algal, de Nutrición avanzada, S.A. Estos constituyen el punto de partida para el establecimiento de los cultivos de ensayo. En todos los casos fueron utilizados para los subcultivos en la fase exponencial de crecimiento (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Efectos de algunos nutrientes en el crecimiento de las algas.

<b>Nutrientes</b>	<b>Efectos en el crecimiento de las Algas</b>
Calcio y Magnesio	Son subproductos de fotosíntesis.
Cobre	Extremamente tóxico a las algas en rango de 0.1 - 3.0 ppm. Algunas pueden llegar a tolerar al cobre como por ejemplo los <i>Protococcus</i> .
Calcio	No es esencial para muchas algas.
Sílice	Necesario para crecimiento de las diatomeas.
Cloro	Tóxico para muchas algas; se utiliza en un rango de 0.3 - 3.0 ppm.
Hidróxido de calcio (lime)	Un exceso de este puede traer como consecuencia su muerte (se introduce para alteración del pH).
Fenoles	No tienen efectos tóxicos en diatomeas. Se tolera hasta una concentración de 1.9 mg/L.

### **2.5. Caracterización de la vinaza.**

La vinaza es un residuo industrial del proceso de la destilación alcohólica que posee características propias, que lo convierten en un agente muy contaminante del medio ambiente, incrementan la temperatura del cuerpo receptor de agua cuando son vertidas y disminuyen la cantidad de oxígeno disuelto disponible, además cuando no son neutralizadas pueden disolver algunos metales. Esta contiene todos los componentes del mosto que han sido arrastrados por el vapor de agua así como cantidades de azúcar residual y componentes volátiles, también posee materia orgánica abundante que incluye una cantidad considerable de fenoles y sus polímeros, los cuales son difíciles de degradar biológicamente y poseen propiedades antimicrobianas y fitotóxicas que impiden el tratamiento eficiente por degradación microbológica, especialmente aerobia (Cobos, 2007).

Su composición es muy variable (Cuellas, 2008) y su contenido de materia orgánica es elevada (Gómez et al., 2000). Se conoce que la vinaza ha sido tratada por métodos biológicamente convencionales, fundamentalmente anaerobios, pero bajo estas condiciones, el color y algunos compuestos de difícil biodegradabilidad permanecen inalterables (Bermúdez et al., 2000), por otra parte, se conoce su aplicación al suelo, considerada como una fertilización de elevada

eficiencia pues, además de dar a la tierra los nutrientes necesarios, causa una mejora en las condiciones físicas, químicas y bacteriológicas de esta (INESCO, 1979; Sobral et al., 1988).

Estas aguas residuales cuentan con una concentración rica de nutrientes que permitan el desarrollo de las microalgas que requieren nitrógeno y fósforo para su crecimiento (Ge, Liu, & Tian, 2011), usualmente el requerimiento de nitrógeno es de 0,1 a 0,14 en fracción másica (Posten & Schaub, 2009). El cultivo de las mismas en aguas residuales tiene dos objetivos, proveer de nutrientes a las microalgas para su desarrollo y reducir la carga de nutrientes en las mismas (tratamiento terciario).

De manera general los constituyentes de las vinazas son los siguientes:

- Sustancias inorgánicas solubles en las cuales predominan los iones K, Ca y SO<sub>4</sub>.
- Células muertas de levadura.
- Sustancias orgánicas resultantes de los procesos metabólicos de levaduras y microorganismos contaminantes.
- Alcohol y azúcar residual.
- Sustancias orgánicas insolubles.
- Sustancias orgánicas volátiles. (García y Rojas, 2006).

Su composición depende de las características de la materia prima usada en la producción de alcohol, del sustrato empleado en la fermentación, del tipo y eficiencia de la fermentación y destilación.

En la Tabla 2.4. se muestra la composición química promedio de las vinazas estudiadas, así como los valores máximos y mínimos. El contenido de DQO de las vinazas aunque elevado, como es característico de este tipo de residual, se encuentra muy por debajo de los 100 000 mg. mL<sup>-1</sup>, a menudo reportados en la literatura (Al-Widyan and Al-Shyoukh 2002).

Tabla 2.4. Composición química de las vinazas.

		Promedio	Desv. Estand.	Xmáx	Xmín	n
DQOt	g/L	<b>71,20</b>	29,27	168,4	26,4	49
DBOt	g/L	49,94	7,68	63,3	38,4	14
pH		<b>4,47</b>	0,43	6,4	4	46
ST	g/L	52,67	4,15	60,46	45,47	14
STF	g/L	12,61	0,90	13,7	11,12	6
STV	g/L	38,67	4,29	44,25	33,05	6
SST	g/L	<b>10,70</b>	5,12	18,03	1,42	14
SSF	g/L	3,39	2,91	8,89	0,91	6
SSV	g/L	7,31	6,14	17,26	1,47	6
SDT	g/L	41,97	8,11	52,54	30,7	6
SDF	g/L	9,23	2,67	12,19	4,18	6
SDV	g/L	31,08	8,24	40,38	19,1	6
CE	mS/cm	<b>8,36</b>	2,86	13,41	6,6	5
Sulfatos	g/L	15,81	29,53	76	2,893	6
Nitrógeno	g/L	<b>0,21</b>	0,10	0,322	0,02	6
Fósforo	g/L	<b>0,11</b>	87,53	181,16	0,189	6
Calcio	g/L	0,55	0,34	1,2	0,26	6
STV/ST		0,75	0,02	0,77	0,73	6
SSV/SST		0,68	0,64	2,07	0,28	6

## 2.6. Condiciones generales de los cultivos de ensayo.

Se establecen cultivos sobre el residual así como controles en medio Bristol. La cinética de crecimiento se sigue durante 15 días.

### 2.6.1. Ajuste de parámetros de cultivo.

- pH y temperatura.

El pH fue medido después de la esterilización de cada uno de los medios, para lo que se emplearon tiras Panreac con escala de color (3.8 - 5.5 y 6.0 - 8.1 u).

Los cultivos se desarrollan en una cámara de cultivo con una temperatura promedio de  $20 \pm 2$  °C. La temperatura fue medida con un termómetro electrónico profesional Quartz de Oregon Scientific.

- Aireación.

El flujo de aire aplicado a los cultivos fue de  $0.45 \text{ L min}^{-1}$ , para ello se empleó aire atmosférico durante 15 días. Se mantuvo el flujo constante para garantizar las condiciones óptimas para el crecimiento.

- Medición de la densidad de flujo fotónico (DFF).

Los cultivos se mantuvieron en régimen de luz continua, para lo cual se utilizaron lámparas fluorescentes Daylight F40T 12/D 40 W PHILIPS. La DFF fue ajustada diariamente utilizando un Luxómetro Digital Voltcraft MS/1300 (200-50000 lux) con sensor instalado permanentemente, fotodiodo integrado y un filtro sensible a la radiación fotosintéticamente activa (PAR). La DFF fue de  $75 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para los no aireados y  $58.59 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para los aireados. Para la conversión de lux a  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  se utilizó el factor de conversión: 51.2 (Ginzburg 1987).

## 2.7. Determinaciones experimentales.

### 2.7.1. Determinaciones sobre células en cultivo.

- Densidad celular.

La densidad celular se determina por recuento diario de una alícuota del cultivo en cámara de recuento hematológica Neubauer mejorada, utilizando un microscopio óptico MOTIC (40x). Se realizaron diluciones en agua destilada siempre que fue necesario, de forma tal que el número de células contadas por campo en  $1 \text{ mm}^2$  se encontrase entre 30 y 300. (Figura 2.2)

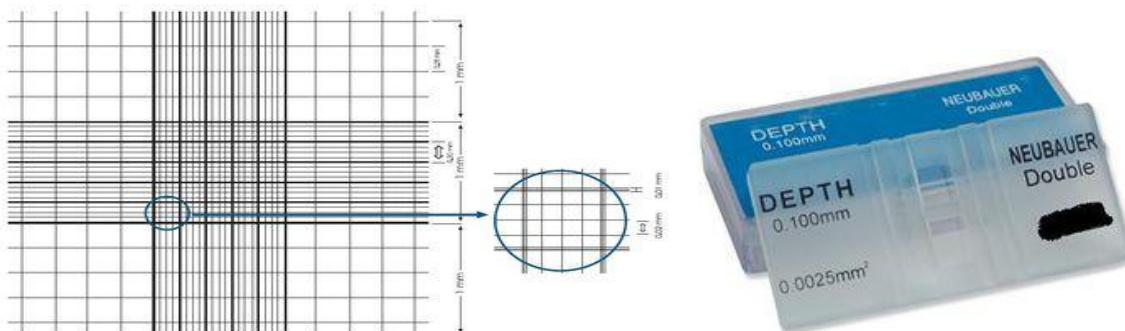


Figura 2.2. Cámara de recuento hematológica Neubauer mejorada.

A partir de los datos diarios de densidad celular se determina la tasa de crecimiento, esta se calcula mediante la expresión:

$$\mu = \ln N_t / N_0 / (t - t_0) = [(\ln N_t / N_0) / g] \cdot \ln 2$$

Donde:

$N_t$  y  $N_0$ : densidades celulares (cél.mL<sup>-1</sup>)

$t_t$  y  $t_0$ : tiempos

g: coeficiente del crecimiento balanceado

- Determinación de la concentración de clorofila *a*.

Las células fueron recogidas por centrifugación a 14 630 rpm, 10 min en una centrífuga Sigma 1-14, a partir de volúmenes preestablecidos (2 mL). El sobrenadante se retira cuidadosamente y se recoge la biomasa, a la que se añade un volumen determinado de metanol (1 mL).

Las muestras se resuspenden con ayuda de un vórtex; se centrifugan durante 10 min a 14 630 rpm para clarificar el sobrenadante. La lectura espectrofotométrica de las muestras se realiza a 665 nm, en un espectrofotómetro Genesys 10UV con un paso de luz de 1 cm, y un rango de resolución de 1 nm (Anexo 4). Para el cálculo de la concentración de clorofila *a* se utiliza como coeficiente de extinción molar a 665 nm (74.46 mL mg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) (Rivas, Fontes et al. 1992).

El contenido de clorofila *a* se calcula mediante la siguiente fórmula, aplicando la Ley de Lambert Beer y por acidificación de la muestra, se determinan las concentraciones de feopigmentos para corregir los valores obtenidos.

$$\mu\text{g clorofila } a \text{ mL}^{-1} = 13.43 \times (A_{665})^* (\text{vol. extracto} / \text{vol. cultivo})$$

Después de la determinación de clorofila se realizan las correcciones pertinentes con las lecturas a 750 nm para la turbidez y la corrección mediante la resta de la concentración de feopigmentos los que se determinan a través de la acidificación de la muestra en extracto metanólico con 0.1 mL de HCl (3M), luego se agita y después de 5 min se leen los feopigmentos a la misma longitud de onda (665 nm). Los resultados se expresan en pigm célula<sup>-1</sup>.

- Integridad y morfología de las algas.

Se evaluó la integridad de las células en cultivo por medio de la observación al Microscopio óptico, observándose que al aumentar los días estas iban disminuyendo en cuanto a su tamaño

debido a la presencia de determinados compuestos (fenoles, amonio, etc.) presentes en la vinaza que traen como consecuencia la inhibición del crecimiento celular.

## 2.8. Análisis de los resultados.

### 2.8.1. Cultivos estáticos.

Se estudió el cultivo de *C. vulgaris* en medios estáticos simulando lagunas de oxidación sin consumo de energía para el mezclado con diferentes concentraciones de vinazas, determinando el crecimiento celular y la concentración de clorofila a.

Como se presenta en la Figura 2.3, los cultivos de *C. vulgaris* inoculados con vinaza, mostraron evidencias de efecto tóxico en los parámetros medidos en dichos experimentos.

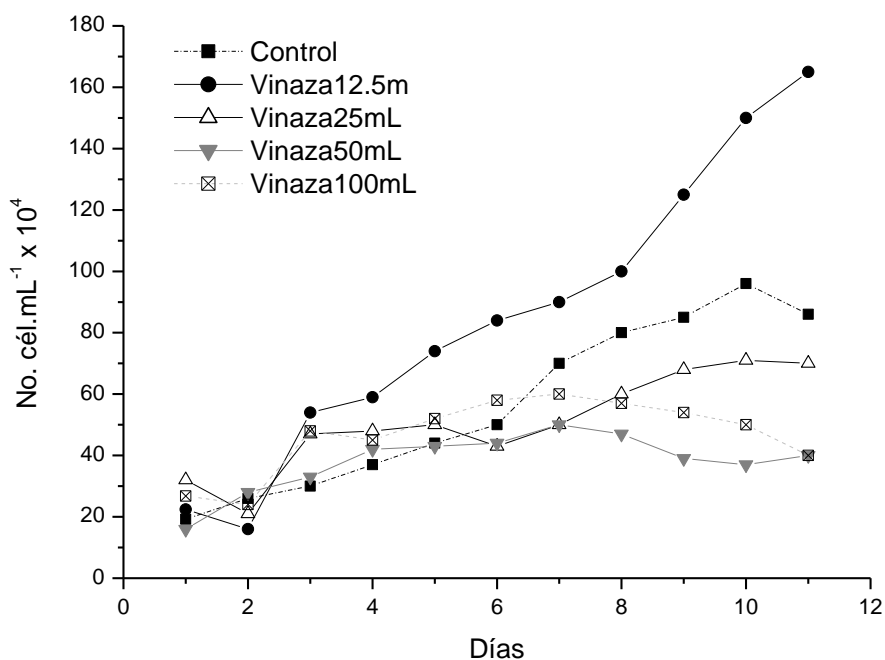


Figura 2.3. Cinética de cultivos de *Chlorella vulgaris* no aireados (150 mL) con diferentes concentraciones de vinaza y control con medio Bristol.

Del análisis del gráfico se infiere que *C. vulgaris* es capaz de crecer sobre el residual; sin embargo, se afecta la densidad celular, lo que resulta evidente al comparar contra el control, sin embargo en el procedimiento experimental vemos que el mayor crecimiento se observa en primer lugar en el cultivo con menor concentración de vinaza (12.5 mL), seguido por el control lo que puede explicarse debido a que la vinaza como ha sido mencionado anteriormente

contiene nutrientes que permiten el crecimiento microalgal y enriquecieron el medio, aunque también contiene elementos que afectan el crecimiento, pero al ser este el experimento de menor concentración de vinaza, las cantidades añadidas son asimilables por la *C. vulgaris* que tiene una gran adaptabilidad a diferentes medios. En los demás experimentos al aumentar la concentración de vinaza aumentan los nutrientes en el medio a la vez que los elementos limitantes del crecimiento contenidos en ella por lo que la densidad celular fue menor.

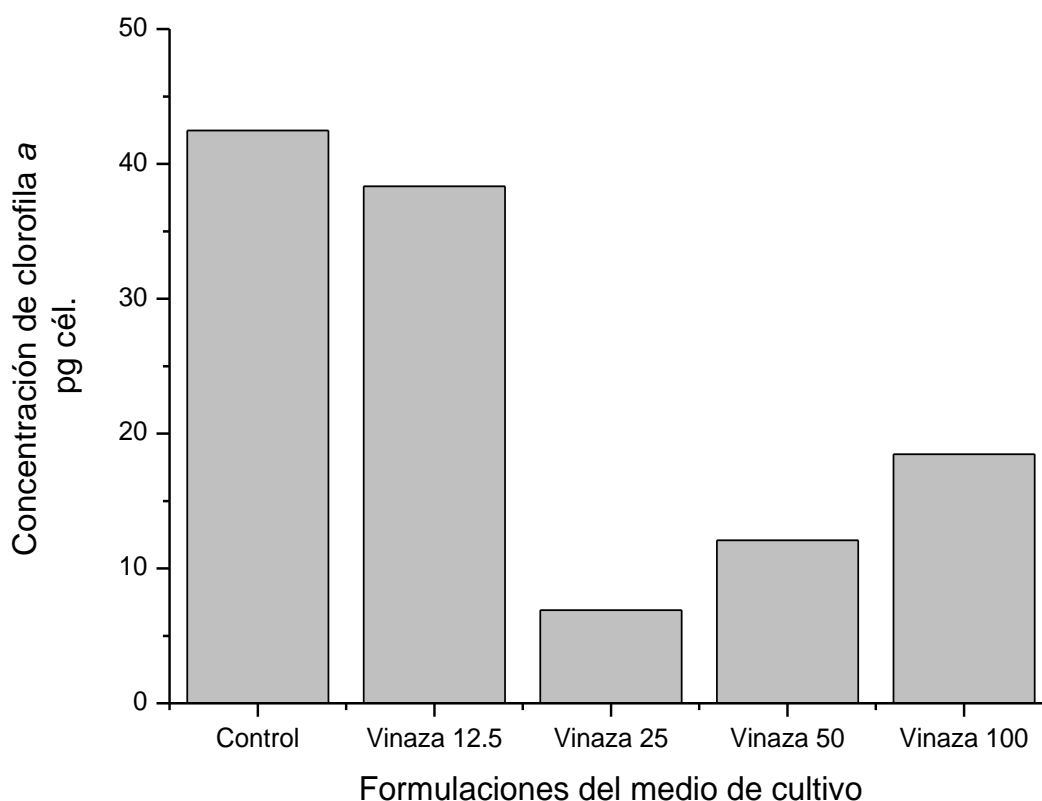


Figura 2.4. Variación de la concentración de clorofila *a* por célula (pg cél.<sup>-1</sup>) en cultivos de *Chlorella vulgaris* no aireados (150 mL) con diferentes concentraciones de vinaza y control con medio Bristol al día 15 de cultivo.

En el caso de la concentración de clorofila *a* (Figura 2.4.), pigmento primario presente en todas las algas vemos como la mayor cantidad de la misma se obtiene en el control seguida por el cultivo con menor concentración de vinaza (12.5 mL), luego disminuye bruscamente cuando se aumenta la concentración del residual a 25 mL; valor a partir del cual ocurre un aumento progresivo de la concentración de clorofila con el aumento de la concentración de vinaza, por lo

que podemos decir que al inhibirse el crecimiento, los nutrientes contenidos en el medio son empleados en la producción de clorofila.

Comparando los resultados obtenidos en cuanto a densidad celular y concentración de clorofila *a* en los experimentos no aireados, podemos concluir que la vinaza en bajas concentraciones enriquece el medio provocando un efecto favorable en la densidad celular sin afectar mucho la concentración de clorofila ya que las sustancias limitantes que aporta todavía son asimilables por esta especie de microalga, sin embargo al aumentar la concentración de vinaza se limita el crecimiento disminuyendo la densidad celular y se ejerce el efecto contrario en la concentración de clorofila *a*, ya que los nutrientes aportados por la vinaza son utilizados en la producción de la misma.

### 2.8.2. Cultivos aireados.

Parte de los medios de cultivos aireados de *C. vulgaris* son restituidos por vinaza en su fase de crecimiento exponencial mostrando evidencias de efecto tóxico al igual que en los cultivos estáticos. Figura 2.5.

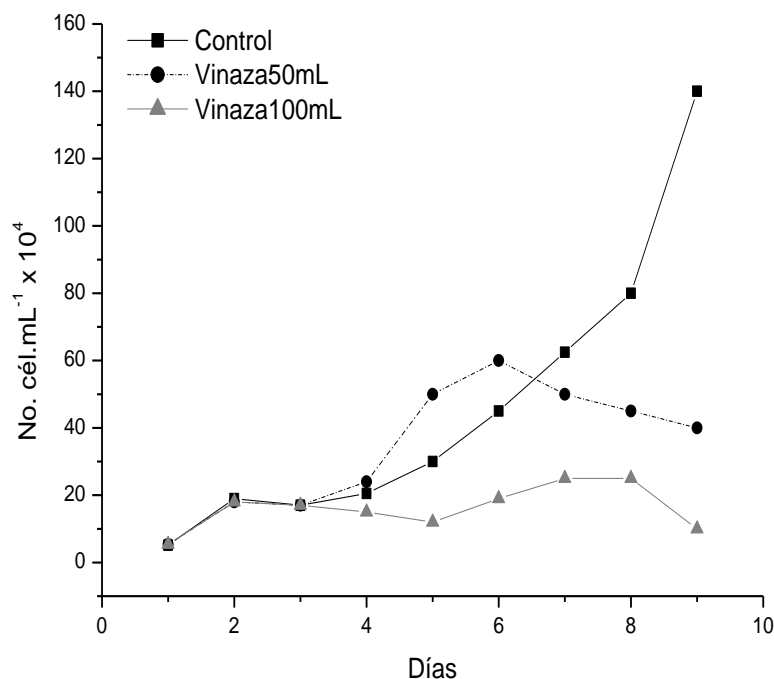


Figura 2.5. Cinética de cultivos de *Chlorella vulgaris* aireados (250 mL) expuestos a diferentes concentraciones de vinaza y control con medio Bristol.

Se realizan cuatro experimentos en los cuales se restituye parte del medio al sexto día de cultivo, en dos de ellos se restituye por medio Bristol fresco en diferentes proporciones, como ambos manifestaron resultados similares se halló una media y se tomó como control. En los restantes parte del medio de cultivo fue restituido por diferentes concentraciones de vinaza, lo cual afectó drásticamente el crecimiento de *C. vulgaris* con respecto al control; comportamiento que podría deberse a la muerte celular inmediata de un porcentaje significativo de la población; al incorporarse sustancias tóxicas, mostrando un comportamiento con tendencia a la muerte.

En estos experimentos aireados se calcula la tasa de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) que resultó ser mayor para el control con un valor de  $4.33 \text{ días}^{-1}$  prácticamente el doble con respecto a las tasas máximas de crecimiento de los experimentos donde se restituyó parte del medio con vinaza en cantidades de 50 mL y 100 mL, cuyos resultados fueron 2.49 y 2.45, respectivamente, lo que evidencia una limitación en el crecimiento con el aumento de la concentración de vinaza.

De los análisis realizados se infiere que; la vinaza limita el crecimiento de dicha microalga no resultando una alternativa para el desarrollo en cultivos densos, sin preparación previa, lo que puede estar relacionado con las grandes concentraciones de amonio y nitrito presentes en la misma, siendo algunas microalgas sensibles a altas concentraciones de amonio lo cual resulta perjudicial ya que pueden inhibir su crecimiento, esto puede estar relacionado con un aumento del pH interno, debido a la penetración de moléculas de hidróxido amónico no disociadas (Morris, 1974). Por encima de pH 7, el  $\text{NH}_3$  libre se hace disponible, y la difusión de este aumentara el pH interno, a diferencia del  $\text{NH}_4^+$  (Gómez, 1997). De igual manera, el nitrito en altas concentraciones puede inhibir el crecimiento microalgal (Cresswell and Syrett, 1982). La vinaza presenta también melanoidinas, tóxicas para los microorganismos a cultivar en ese medio (Fitzgibbon et al., 1995, Verma, 1976),

Una vía para solucionar esta problemática sería la mezcla de la vinaza con otros residuales disponibles que aporten los elementos deficitarios, una vez que se haya diluido la misma hasta concentraciones de sustancias tóxicas permisibles para el crecimiento de las microalgas. Las aguas residuales del proceso azucarero o de otras industrias de producción de alimentos podrían ser empleadas con este fin. Resulta válido señalar que ya han sido evaluadas algunas alternativas para la producción de microalgas a partir de residuales, como por ejemplo, los residuales de la industria láctea. (González, C., 2006; Gómez Luna, L, 2011)

Sin embargo para la clorofila tiene un efecto contrario ya que al inhibirse el crecimiento por sustancias tóxicas presentes en el medio, los nutrientes disponibles son utilizados por las microalgas para la producción de clorofila *a*.

### Capítulo 3: Diseño preliminar de una planta para el cultivo de biomasa.

#### 3.1. Diseño preliminar de una planta piloto para la obtención de biomasa microalgal.

El proceso cultivo de microalgas para la obtención de biomasa consta de varias etapas.

A continuación se muestra la figura 3.1, el diagrama de bloque del proceso.

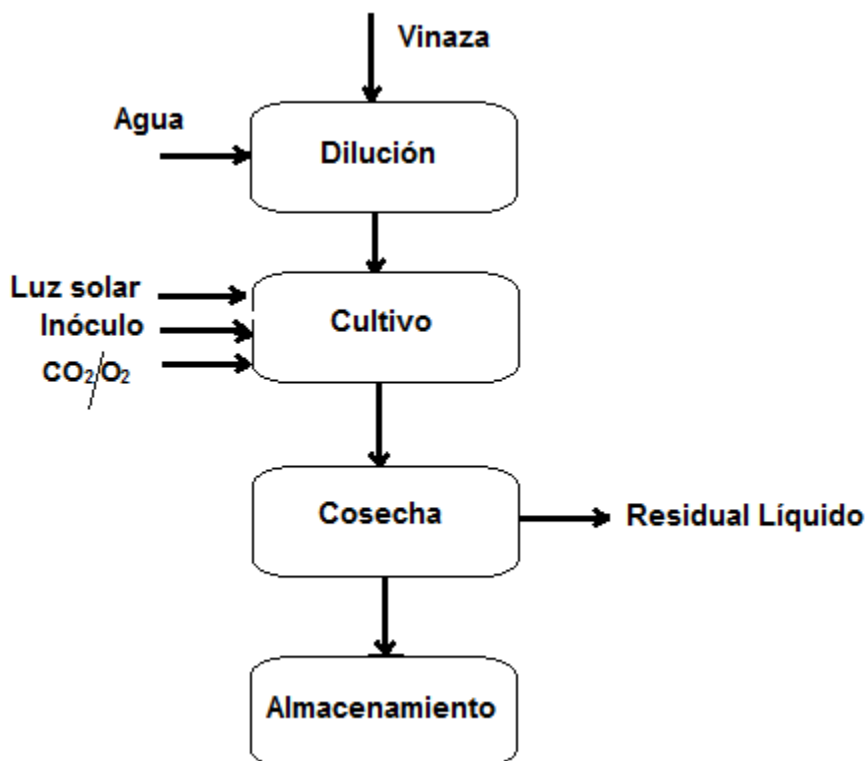


Figura 3.1. Diagrama de bloque del proceso.

#### 3.2. Selección preliminar del equipamiento.

La selección de los equipos se realizó mediante el texto de Diseño y Economía de los Procesos de Ingeniería Química (Ulrich, 1985)

##### 3.2.1. Tanques de Almacenamiento.

El tanque que se usará para la preparación de la materia prima (dilución) será un tanque cilíndrico de fondo cónico elevado para facilitar el suministro por gravedad a la siguiente etapa,

se necesita además un tanque cilíndrico de fondo plano para el almacenamiento del producto final.

### **3.2.2. Estanque.**

El cultivo de biomasa microalgal se desarrollará en estanque a cielo abierto, en condiciones mixotróficas y con la utilización de residuales como una fuente barata de nutrientes, para reducir los costos de producción. Se propone la instalación de un solo estanque (forma circular) ya que se abaratan los costos de construcción, agitación, transportación de inóculo, etc. Uno de los parámetros más importantes será la profundidad del estanque la cual no excederá de 1 m.

### **3.2.3. Filtro.**

Para la cosecha de la biomasa se utilizará un filtro que por su modo de operación pueden ser de acción periódica o continuos (por ser este un proceso a Batch se selecciona el primero). Los filtros de acción periódica se usan en la producción industrial fundamentalmente para pequeñas producciones, aunque necesitan de mayor cantidad de trabajo de los operarios. Se selecciona el filtro prensa de marcos y platos, estos se fabrican en un amplio rango de tamaños, son aparatos compactos que ocupan poco espacio y pueden presentar una superficie de filtración de hasta 140 m<sup>2</sup>; en la actualidad se fabrican también con descarga automática y con mecanismos automáticos para armar y desarmar la instalación, aunque presenta dificultad a la hora de extraer la torta y al recambiar la bolsa.

### **3.3. Balance de materiales.**

Para la realización de los balances se partió de una disponibilidad de 50 L de vinaza diluida y las productividades de biomasa y lípidos reportados por (Montero Sánchez.; 2013) para la especie *Chlorella vulgaris* en este medio, siendo las mismas 0.150 g/l/d y 42.49 mg/l/d respectivamente. Tomando como base de cálculo 1 día. Se realizan los balances parciales de biomasa en base a la función total del proceso (Figura 3.2.). Se inoculan  $5 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>, ya que con este valor de inoculación se obtuvo el mayor crecimiento y el menor tiempo de generación de la especie *Chlorella vulgaris* en un estudio realizado en México según [revfitotecnia@hotmail.com](mailto:revfitotecnia@hotmail.com).

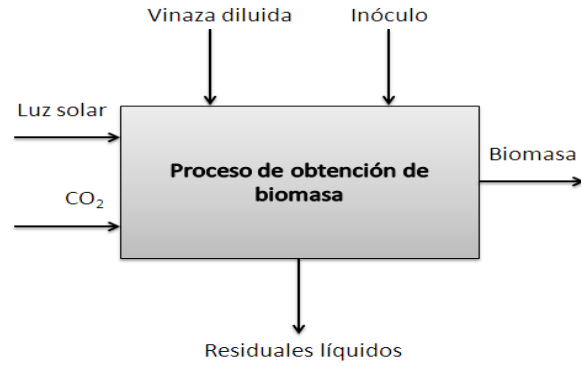


Figura 3.2. Función total del proceso.

Ecuaciones:

$$Entra + Genera - Consume = Sale \quad (1)$$

$$m_i + m_{gv} + m_{gc} + m_{g Ls} = m_T \quad (2)$$

Donde:

$m_i$ : masa de biomasa en el inóculo

$m_{gv}$ : masa de biomasa generada por la vinaza

$m_{gc}$ : masa de biomasa generada por el carbono

$m_{g Ls}$ : masa de biomasa generada por la luz solar

$m_T$ : masa total de biomasa

$T_c$ : Tasa de crecimiento (50 mL)

**Tabla 3.1. Balances parciales de biomasa.**

Datos	Ecuaciones	Resultados
Inóculo = $5 \times 10^6$ células mL <sup>-1</sup> .	$m_i = \text{Inóculo} \times \text{Factor de conversión} \times$ Volumen a inocular.	$m_i = 22.5$ g
Volumen a inocular = 50 L.		
Factor de conversión = $9 \times 10^{-11}$ g/cél.	$m_{gv} = \text{Productividad} \times \text{Volumen a inocular}$	$m_{gv} = 7.5$ g
Productividad = 0.150 g/L.	$m_T = m_i + m_i \times T_c$	$m_T = 79.53$ g
$m_g c = 0.5$ g		
$T_c = 2.49$	$m_i + m_{gv} + m_g c + m_g L_s = m_T$	$m_g L_s = 49.03$ g

### 3.4. Dimensionamiento de los equipos.

**3.4.1 Tanques de Almacenamiento. (un tanque de fondo cónico para la dilución y uno de fondo plano para el almacenamiento de la biomasa).**

**Tabla 3.2. Diseño (Tanque de dilución)**

Parámetros	Valores	UM
Volumen	0.05	m <sup>3</sup>
Diámetro	0.3	m
Altura	0.6	m
Material de construcción	PVC	
Temp. de almacenamiento	30	°C
Presión de trabajo	1	atm

**Tabla 3.3. Diseño (Tanque de almacenamiento de biomasa).**

Parámetros	Valores	UM
Volumen	0.085	m <sup>3</sup>
Diámetro	0.4	m
Altura	0.9	m
Material de construcción	PVC	
Temp. de almacenamiento	30	°C
Presión de trabajo	1	atm

**3.4.2. Estanque.**

**Tabla 3.4. Diseño del estanque**

Parámetros	Valores	UM
Volumen	0.05	m <sup>3</sup>
Altura	1	m
Área	0.07	m <sup>2</sup>

### 3.4.3. Filtro

Tabla 3.5. Diseño (Filtro de Marcos y Platos).

Parámetro	Datos	Ecuación	Resultado
Masa de sólidos en la torta /unidad de volumen de líquido	x=0.25	$X_t = \frac{x}{1-x}$	0.33
Masa de sólidos /Masa de líquido( $X_s$ )	x=0.12	$X_s = \frac{x}{1-x}$	0.14
Masa de sólidos en la suspensión/unidad de volumen de líquido	$\rho_s=1270\text{Kg/m}^3$	$C_s = X_s * \rho_s$	177.8
Masa de sólidos en la torta/unidad de volumen filtrado(C)	$\rho_t=937 \text{ Kg/m}^3$	$C = \frac{C_s}{1 - \left( \frac{C_s}{X_t * \rho_t} \right)}$	418.36
Superficie de filtración (S)	$h_{\text{marco}}=0.08\text{m}$ $V_{\text{filtrado}}: 0,05 \text{ m}^3$	$S=CV/X_t * \rho_t * h$	$S= 0.85\text{m}^2$

### 3.5. Sistemas auxiliares.

#### 3.5.1. Sistema de bombeo.

Se emplea la bomba centrífuga de flujo axial por las características de los fluidos a tratar. Esta es una de las bombas más importantes y populares en la industria de proceso químico; valiosa para mover grandes volúmenes con bajos diferenciales de presión. Tienen bajos costos de instalación y mantenimiento.

Tabla 3.6. Diseño (Bomba para llevar la biomasa con vinaza y medio al filtro).

Parámetro	Datos	Ecuación	Resultados
	$\Delta Z = 3 \text{ m}$	$H = \Delta Z + \left(\frac{\Delta P}{\rho} * g\right) + \left(\frac{\alpha * \Delta V^2}{2} * g\right) + h_p$	
	$v = 1,5 \text{ m/s}$		$f = 0,026$
	$D = 0,019 \text{ m}$	$\Delta Z = Z_2 - Z_1$	Fig 3.9
	$\mu: 0.0031 \text{ Pa*s}$	$h_p = \left(\frac{f * L}{D} + \sum K\right) * \left(\frac{V^2}{2 * g}\right)$	hpt=4.9m
Carga	$\rho: 1216 \text{ Kg/m}^3$		$Re = \frac{v * D * \rho}{\mu}$
	$\sum K = 4.09$		H = 7.4m
	L = 15 m		
Flujo(m <sup>3</sup> /s)	$V_v = 6.18 * 10^{-4} \text{ m}^3$	$Q_v = Q_m * \rho$	0.0006
	$\rho: 1216 \text{ Kg/m}^3$		
Potencia	$\eta = 85\%$	$N = \frac{\rho * g * H * Q}{1000\eta}$	N=3.53kW

Fuente: Rosabal

Tabla 3.7. Tabla de cálculo de Coeficiente de Resistencia local.

Accesorios	K	
	Cantidad	Total
Entrada en un tubo desde un depósito de gran volumen	1	0.5

Codos de 90° estándar	3	2.25
Válvulas compuerta abierta	2	0.34
Salida de un tubo a un gran depósito	1	1
<b>ΣK</b>		<b>4.09</b>

### **3.5.2 Sistema de inyección del CO<sub>2</sub>.**

El sistema de inyección de CO<sub>2</sub> consiste en un cilindro de metal con una llave de salida y una válvula de seguridad, que contiene el CO<sub>2</sub> a alta presión, del orden de 60 a 80 bar con un manorreductor a la salida que regula la presión de salida hasta los 0,5 a 1 bar provisto de un medidor de presión (manómetro), que indica tanto la presión de salida del CO<sub>2</sub> como la presión a la que se encuentra el gas en el interior del cilindro. Una vez controlada la salida del gas a baja presión hay que afinar todavía más su salida, para ello se dispone de una válvula de aguja que consiste en una aguja cónica sujeta a un tornillo, de manera que al actuar sobre él deja pasar más o menos cantidad de gas por el menor o mayor asiento del cono en su alojamiento.

### 3.6. Análisis económico.

#### 3.6.1. Estimación del costo total de inversión.

Costo de adquisición del equipamiento

$$Costo_{Actual} = Costo_{Original} \frac{Indice_{Actual}}{Indice_{Original}}$$

Índice actual.....567,3

Índice original.....356 año 1991 (Peters, 1991)

**Tabla 3.8. Costo de adquisición del equipamiento.**

Equipos	No de Equipos	Costo original (\$)	Costo actual (\$)	Referencia bibliográfica
Estanque	1		10	<a href="http://www.biod2.luzardomarine.com">www.biod2.luzardomarine.com</a>
Sistema de Inyección CO2	1		500	
Tanques	2	1 500	2 389,04	<b>Peters, 1991</b>
Filtro	1	2059.52	3 280,19	
Bombas	1	500	796,35	
Válvulas	5	60	95,56	
<b>Costo Total (\$).</b>			9842.2	

La estimación del costo total de inversión se realizó utilizando los factores de proporción y las ecuaciones correspondientes a la tabla 17 del Peters, adaptándola a las características de la inversión.

CTI = Costo Fijo de Inversión (CFI) + Inversión de Trabajo (IT)

CTI = CFI + IT

IT = 15 % CTI

CFI = Costos directos + C.indirectos + Derecho de contrato + Contingencia

**Tabla 3.9. Estimación del Costo Total de Inversión.**

**Estimación de los Costos Directos**

<b>Componentes</b>	<b>%</b>	<b>Costo (\$)</b>
Costo del equipamiento (E)		9842.2
Instalación	39% E	3838.45
Instrumentación	13% E	1279.48
Instalaciones eléctricas	10% E	984.22
Tuberías	31% E	3051.08
Facilidades de servicio	55% E	5413.21
<b>CD</b>		<b>14 566</b>

**Estimación de los Costos Indirectos**

<b>Componentes</b>	<b>%</b>	<b>Costo (\$)</b>
Ingeniería y supervisión	32% E	3149.5
<b>CI</b>		<b>3149.5</b>

**CD + CI** **17 715.94**

<b>Otros Componentes</b>	<b>%</b>	<b>Costo (\$)</b>
Derecho de contrato	5% (CD + CI)	885.79
Contingencia	10% (CD + CI)	1771.59

**Costo Fijo de Inversión (CFI)** **20 373.32**

**Costo Total de Inversión(CTI)** **23 968.61**

**3.6.2 Costos Totales de producción.**

Para la estimación del costo total de producción se utilizaron los factores de proporción y las ecuaciones correspondientes que se encuentran en la tabla 27 del Peters.

CTP = Costo de fabricación (CF) + Gastos Generales (GG)

CTP = CF+ GG

CF = Costos directos (CD) + Cargos Fijos (Cf) + Costos Indirectos (CI)

$$CF = CD + Cf + CI$$

$$GG = \text{Distribución y venta (DV)} + \text{Admon (A)} + \text{Inves. y Des. (ID)}$$

$$\text{Depreciación} = \frac{CFI - VR}{Vd}$$

VR: valor residual, asumimos VR=0

VD: vida útil igual a 15 años.

**Tabla 3.10. Estimación del Costo Total de Producción.**

**Estimación de los Costos Directos**

<b>Componentes</b>	<b>%</b>	<b>Costo (\$)</b>
Materia prima ( inóculo, benceno, vinaza, CO <sub>2</sub> )		880
Mano de obra	-	1 005
Supervisión	15% Mano de obra	150,75
Requerimientos	-	1 215
Mantenimiento y reparación	2%CFI	891,64
Suministro	0,5% CFI	222,90

**Estimación de Cargos Fijos**

<b>Componentes</b>	<b>%</b>	<b>Costo (\$)</b>
Depreciación		2 972,13
Impuestos	1%CFI	203.73
Seguros	0,4% CFI	81.49

**CF = 3257.35**

**Estimación de los Costos Indirectos**

Costos indirectos	50%(Mantenimiento y reparación+ Mano de obra +Supervisión)	<b>1 185,38</b>
-------------------	---	-----------------

**Gastos Generales**

<b>Componentes</b>	<b>%</b>	<b>Costo (\$)</b>
Administrativos	2% CTP	174.24
Distribución y ventas	2%CTP	174.24
Investigación y desarrollo	5%CTP	435.60

**GG = 0,09 CTP**

Como  $CTP = CD + CF + CI + GG$ , sustituyendo las ecuaciones obtenidas en las tablas anteriores tenemos que:

$$CTP = 8712.12 \text{ \$/año}$$

**3.6.3. Cálculo de la Ganancia**

Ganancia= Precio de venta del producto-CTP

Tabla 3.11. Determinación de la ganancia.

<b>Producto</b>	<b>Precio</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Anual</b>	<b>Valor del Producto (\$/año)</b>
		<b>(Kg/año)</b>		
<b>Biomasa seca</b>	1.25 (\$/kg)	20		25
<b>Ganancia (\$)</b>				-8712.12

**Conclusiones.**

1. Se pueden utilizar las vinazas de destilería como medio de cultivo para la obtención de biomasa microalgal, pues contienen todos los macro y micronutrientes necesarios para el cultivo de *C. vulgaris*, objeto de estudio del presente trabajo.
2. La presencia de sustancias tóxicas en las vinazas de destilería inhiben el crecimiento microalgal, por lo que se hace indispensable la preparación previa de esta materia prima, constituyendo una fuente barata de nutrientes.
3. Se confirma que en condiciones de estrés se inhibe el crecimiento microalgal, pero se sintetizan otros compuestos de alto valor agregado, como es el caso de la clorofila *a*.
4. El análisis económico para una planta piloto de producción de biomasa con capacidad de 50 L/día de vinaza diluida demostró que no es factible, obteniéndose como resultado un costo total de inversión de \$23 968.61 y un costo total de producción de 8712.12 \$/año, respectivamente, reportando pérdidas de 8712.12 \$/año.

**Recomendaciones**

1. Incluir en el estudio la mezcla con otros sustratos para suplir el déficit de nutrientes provocado por la dilución de la vinaza.
2. Evaluar el efecto del CO<sub>2</sub> en el cultivo a escala de laboratorio con vistas a un futuro escalado de la planta.
3. Estudiar a escala de laboratorio la productividad de lípidos en la biomasa microalgal, como base para la producción de biodiesel.

**Bibliografía**

1. ABALDE, J., A. CID, P. FIDALGO, E. TORRES and C. HERRERO (1995). "Microalgas, Cultivo y Aplicaciones". Universidad da Coruña.
2. ALBARRACIN, I.; PROSPERI, C.; MALERBA, M. 2004. "Bioensayos con *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda* como indicadoras de eutrofización: Respuesta de ambas especies en condiciones controladas de cultivo". Revista cubana de Investigaciones Pesqueras. ISSN Cuba 0138-8452. Número Especial.
3. ALBARRACIN I., CRAVERO M., ROMERO T. 2005. "Observaciones preliminares sobre crecimiento de *Chlorella vulgaris* en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut. Argentina". Revista AGUA- Tecnología y Tratamiento- Saneamiento Ambiental. ISSN 0325-6235. 30 (155): 63-70.
4. AL-WIDYAN, M. I. and A. O. AL-SHYOUKH. 2002. "Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel." *Bioresource Technology* 85(3): 253-256.
5. ANTIA, N. J. and J. Y. CHENG. 1982. "The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae." *British Phycological Journal* 17: 39-50.
6. APT, K. E.; BEHRENS, P. 1999. "Commercial developments in microalgal"
7. *biotechnology. J. Phycol.* 35: 215-226.
8. ARREDONDO, J. L., G. DE LARA-ISASSI and V. E. BASURTO. 1993. "Bioabono líquido como medio de cultivo para microalgas". LII Congreso Latinoamericano, I Reunión Iberoamericana y I Congreso Mexicano de la Sociedad de Ficología de América Latina y El Caribe, México.
9. BARSANTI, L; GUALTIERI, P. "Algae-anatomy, biochemistry and biotechnology". CRC Press. 2006
10. BECKER, E. W. 1994. "Microalgae: Biotechnology and Microbiology". Cambridge University Press.
11. BECKER, E.W., 1994. "Microalgae. Biotechnology and Microbiology". Cambridge University Press, Cambridge.

12. BENEMANN J.R., DUNAHAY T., ROESSLER P., SHEEHAN J.. 1998. "A look back at the U.S Department of Energy's Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae". National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, U.S.
13. BENEMANN J.R.; WEISSMAN, J.C.; KOOPMAN, B.L.; OSEWALD, W.J. 1977. "Energy production by microbial photosynthesis". *Nature*, 268: 19-23
14. BERMUDEZ, R.C., HOYOS, J., RODRIGUEZ, S.. 2000. "Evaluación de la disminución de la carga contaminante de la vinaza de destilería por tratamiento anaerobio". *Revista Interamericana de Contaminación Ambiental* 16, 23-27
15. BOURRELY, P.1990. "Les algues d'eau douce. Initiation á la systématique". Paris.
16. BOROWITZKA M.A., 1988. "Fats, Oils and Hydrocarbons". *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge,UK.p.257-287.
17. BROWN, L. (2000). "Renewable energy or environmental disaster in the Making?". Worlwatch Institute.
18. CHISTI, Y. 2011. "Biodiesel from microalgae beats bioethanol". *Trends in Biotechnology*. 26(3): 126-131.
19. CHEN, P; MIN M; CHENG Y; WANG L, LI Y; CHEN Q; DENG S; WANG X; YENG C. "Review of the biological and engenerig aspects of algae to fuel approach". *Interface Journal of Agriculturue & Biotechnology* v.2 p.1-30, 2009.
20. CLEBER, B. F., E. SANT' ANNA, B. M. VILLELA da COSTA and O. J. L. BERCELOS (2006). "Lipids, fatty acid composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater." *Grasas y Aceites* 57(3): 270-274.
21. CHISTI, Y. (2006). "Microalgae as sustainable cell factories." *Environmental Engineering and Management Journal* 5(3): 261-274.
22. CHISTI, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae." *Biotechnology Advances* 25(3): 294-306.
23. CHISTI, Y. (2007). "Biodiesel from microalgae". *Biotechnology Advances*. 25: 294-306.

24. CICCARONI P. 1997. "Uso de microalgas para depuración de efluentes de plantas pesqueras en Rawson, Chubut. Argentina". Seminario de Licenciatura. Directora: Isabel Kreibohm de Paternoster, I.; Codirectora: Isabel Albarracín.
25. CIFERRI, O. ; TIBONY, O. 1985. "The biochemistry and industrial potential of
26. Spirulina, Ann". Rev. Microbiol., 39, 503-526 .
27. CLEBER, F.E., SANT' ANNA, M., VILLELA, G.L., BARCELOS, O., 2006. "Lípidos, composición de ácidos grasos y carotenos en *Chlorella vulgaris* cultivadas en solución hidropónica residual". Grasas y aceites, 57, 270-274.
28. COHEN,Z.,M. REUNGJITCHACHAWALI, W. SIANGDUNG & M.TANTICHAROEN. 1993. "Production and partial purification of gamma-linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis* J.appl".Phycol. 5: 109-115.
29. CRESSWELL, R. C., SYRRET, P.J., 1982. "The uptake of nitrite by diatom *Phaeodactylum*: interactions between nitrite and nitrate". Journal of Experimental Botany, 33, 1111-1121.
30. CUELLAS, A., 2008. "Aprovechamiento industrial del suero de quesería. Obtención de una bebida energizante a partir del efluente".
31. DE LA NOUE, J., De PAUW, N. 1988. "The potential of microalgal biotechnology a review of production and uses of microalgae". Biotech. Adv. Vol. 6, pp. 725-770.
32. ECO-BIOD2. 2009. Identificación del proyecto: cultivo y transformación de algas-asturias. Disponible en: [www.biod2.luzardomarine.com](http://www.biod2.luzardomarine.com)
33. EMIRBAS, A. 2009. "Production of biodiesel from algae oils." Energy Sources Part A: Recovery, Utilization & Environmental Effects 31(2): 163-168.
34. DE PAUW, N. and G. PERSOONE. 1998. "Microalgae for aquaculture. Microalgal Biotechnology. M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka". Cambridge, United Kingdom, Cambridge University Press: 197-221.
35. DERNER, B. R.; OHSE, S.; VILLELA, M.; MATOS de CARVALLO, S. ;FETT, R. 2006. "Microalgas, produtos e aplicações". Ciencia Rural, Santa María. Vol 36, N°6:1959-1967.

36. ELISA, P. 2000. "Análisis del desarrollo de los cultivos: medio, agua y especies".
37. EUROPE, I. E. 2010. "Identificación del proyecto: Cultivo y transformación de algas- Austria".
38. FABREGAS, J., C. HERRERO, B. CABEZAS, R. LIANO and J. ABALDE. 1986. "Response of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* to nutrient concentration and salinity variations in batch cultures." *Journal of Plant Physiology* 125: 475-484
39. FIDALGO, J.P., 1995. "Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno". Departamento de Biología Celular y Molecular. Universidad de Coruña, España.
40. FITZGIBBON, F. J., NIGAM, P., SINGH, D., MARCHANT, R. 1995. "Biological treatment of distillery waste for pollution-remediation". *Journal Basic of Microbiology*, 35, 293-301.
41. GARCIA, F., E. MOLINA, A. SANCHEZ, V. GONZALEZ and Y. CHISTI (2001). "Carboxymethyl cellulose protects algal cells against hydrodynamic stress." *Enzyme and Microbial Technology* 29(10): 602-610.
42. GARCIA, A. y ROJAS, C. 2006. "Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de Acuerdo con su modo de Acción en los Suelos". Nota técnica- TECNICAÑA. Colombia.
43. GLORIA, N. A., 1985. "Aplicacao de vinhaca ao solo 1er Encontro Sobre Manejo do Solos". ESALQ., Piracicaba (Brasil)
44. GOLDMAN, J. 1979b. "Outdoor algal mass cultures. II. Photosynthetic yield limitations, *Water Res.*", L3, 119-136.
45. GOMEZ, L. 1997. "Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba". Doctorado Tesis de Doctorado, Universidad de La Coruña.
46. GOMEZ, L., 1997. "Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba". Universidad de la Coruña, La Coruña, pp.265.
47. GOMEZ, R., SANTIESTEBAN, C. M., GALVEZ, L., 2000. Vinaza. "Manual de los derivados de la caña de azúcar". ICIDCA, Ciudad de La Habana, pp.485.

48. GOMEZ L., L., R. D. RIVERO and Á. Inaudis, 2011. "Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético." *Revista Colombiana de Biotecnología* XIII(2): 27-38.
49. GONZALEZ, C. and M. DIAZ. Efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces fragilis*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 2006. **26**(1): p. 35-41.
50. GREENWELL, H.; LAURENS, L.; SHIELDS, R.; LOVITT, R.W., FLYNN, K. "Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges". *Journal of the Royal Society Interface* v. 7, p. 4670-7266, 2010.
51. GUIRY, M. D. and G. M. GUIRY. 2014. "Algaebase. World wide electronic publication". Galway, National University of Ireland
52. GUSCHINA I.A., HARWOOD L.J., 2006. "Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae". *Progress in Lipid Research*, 45:160-186.
53. HALL, D.O. 1986. "The production of biomass: a challenge to our society". In
54. *Handbook of Microbial mass culture*, Richmond (Ed). CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. p. 1-24 .
55. HASE, Ryouetsu; OIKAWA, Hiroyoshi; SASAO, Chiyo; MORITA, Masahiko. "Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Sendai city". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2000, vol. 89, No. 2, p. 157.
56. HORN, S. (2000). "Ethanol production from seaweed extract. *Journal of Industrial, Microbiology & Biotechnology*".
57. INESCO, 1979. "Estudio de la factibilidad para la concentración de vinaza y producción de levadura seca". INESCO Ltda CaliColombia&PROQUIP S.A., Sao Paulo, Brasil.
58. JOHNSON, E. A. and G. H. An. 1991. "Astaxanthin from microbial sources." *Critical Review of Biotechnology* 11: 297-326.

59. KESSLER, E., 1986. "Limits of growth of live *Chlorella* species in the presence of toxic heavy metals". *Arch. Hydrobiol.* 73, 123-128.
60. KOJIMA, H.; Lee Y- K. 2001. "Photosynthetic microorganisms in Environmental Biotechnology". Springer-Verlag. Hong-Kong. 310p.
61. LOURENÇO, S.O. "Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações". São Carlos: RiMa, 2006.
62. LEE, Y-K. 1997. "Commercial production of microalgae en the Asia-Pacific rim". *Journal of Applied Phycology* 9. 403-411
63. LEE, C.-G., KIM, N.-J.& SUH, B.-K. I. S. 2002. "Simple monodimensional model for linear growth rate of photosynthetic microorganisms in flat-plate photobioreactors".(6) 962-971.
64. LEON, I. A. A. (2010). "Estudio do cultivo de *Spirulina platensis* por processo contínuo com uréia como fuente de nitrogenio". Sao Paulo
65. LINCOLN, E.P., EARLE, UJ.F.K., 1990. "Wastewater treatment with microalgae. In: I.Akatsuka (Ed.) *Introduction to Applied Phycology*". SPB Academic Publishing, The Hague, pp.429-446.
66. LIPS, S. H. and AVISSAR. 1986. "Photosynthesis and ultraestructure in microalgae". Boca Raton, Florida.
67. LUNA, N., BEDOLLA, E. y VALDES, Z., 1990. "Constituyentes y propiedades químico físicas de las vinazas de destilerías cubanas." Informe interno.
68. MATA, T. M., A. A. MARTINS and N. S. CAETANO (2009). "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(1): 217-232.
69. MEETING, B. 1998. "Microalgae in agriculture". *Microalgal Biotechnology*. Cambridge, United Kingdom, Cambridge University Press: 288-304.
70. MIAO, X. and Q. WU 2006. "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil." *Bioresource Technology* 97(6): 841-846.

71. MIAO, X. ; WU, Q. 2006. "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil". *Bioresource Technology*, Volume 97, Issue 6.pp 841-846.
72. MONTERO-SANCHEZ, Y. 2009. "Caracterización de la vinaza de la destilería Jesús Rabi". Ciudad de La Habana, ICINAZ: 1.
73. MONTERO-SANCHEZ, Y., A. GALLO, L. M. GOMEZ, I. ALVAREZ, L. C. SABINA, Y. TAMBARA, A. ALVAREZ, M. C. ALFONSO and L. R. RAMIREZ 2013. "Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas". *Medio ambiente, Economía y Desarrollo*. L. Quiñonez and L. G. Luna. Esmeraldas, Ecuador.
74. MONTERO-SANCHEZ, Y., A. GALLO, L. SABINA, J. V. HORMAZA, J. GOMEZ, F. Eng, M. ALFONSO and G. L. M. 2013. "El etanol como factor limitante para el uso de vinaza como medio de cultivo de microalgas". *Medio ambiente, Economía y Desarrollo* L. Quiñonez and L. G. Luna: 181-185.
75. MORA, R., R. MORONTA, J. ORTEGA and E. MORALES 2004. "Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la represa de Tulé." *Ciencia Completa* 12: 1-9.
76. MORRIS, H., Á. ALMARALES, O. CARRILLO and R. ABDALA (2001). "Combinaciones enzimáticas en la obtención de hidrolizados proteicos a partir de *Chlorella vulgaris*." *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 15(2): 85-89.
77. MORRIS, H., M. M. QUINTANA, Á. ALMARALES and L. HERNANDEZ (1999). "Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*." *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 13(2): 123-128.
78. MORRIS, H. J., J. L. BORGES, C. E. MARTINEZ, A. ALMARALES and R. T. ABDALA 2001. "Composición bioquímica y propiedades bioestimulantes de un hidrolizado proteico de la microalga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Chlorophyceae)." *Revista Cubana de Química* XIII(3).
79. MORRIS, H. J., O. CARRILLO and R. C. BERMUDEZ .2003. "Enfoque integral en la utilización de los métodos químicos de evaluación de la calidad proteica." *Revista Cubana de Salud Pública* 29(1).

80. MOSER, M. 2004 "Random Thoughts on Guidelines: How Are They Determined? Are They Followed?".
81. MUERZA, A. 2007. "Algas como combustible."
82. METTING, B. 1985. "Agronomic uses of algae, appl. Phycol". Forum, 2.11.
83. MORRIS, I., 1974. Nitrogen assimilation and protein sintesis. In: W. D. P. Steward (ED.) Algal Physiology&Biochemistry. Blackwell Scientific Pub., Oxford, pp. 583-609.
84. MILLER, A. & COLMAM, G. 1980. "Evidence for HCO<sub>3</sub> transport by the blue-green alga (cyanobacterium) *Coccochloris peniocyctis*". Journal Plant Physiology, 65, 397-402.
85. MA, JIAN. "Microalgae for biodiesel, CO<sub>2</sub> capture and wastewater treatment". 2009. UNLV Renewable Energy Symposium.
86. NAKAYAMA, O. 1980. "A prospect of algal protein production." Nipon Shok. Kog. Gakk 27: 363-370.
87. NIES, 2001. Microbial Culture Collection. National Institute of Envirionmental Studies.
88. OILGAE. 2006. "Aquatic plant growth response to very high CO<sub>2</sub> concentration". Disponible en: <http://www.oilgae.com>
89. OH-HAMA, T., MIYACHI, S., 1988. "Chlorella" . in: M.A.a.B. Borowizka, L. J (Ed.) Microalgal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, pp.3-26.
90. OLGUIN, E. 1984. "Microalgae biomass as source of chemicals, fuels, and
91. Proteins". In sixth Australian Biotechnology Conference. University or
92. Queensland, St. Lucia Brisbane
93. PANIAGUA-MICHEL, J. 1994. "Biotecnología microalgal y obtención de productos químicos y alimenticios". Serie científica, U.A.B.C.S. N° Especial 2(1). pp. 109-117.
94. PAOLI LI ALFARO, G. 2010. Alimentos vivo en maricultura.
95. PEDRAZA, G. X. (1989). "Cultivo de *Spirulina maxima* para suplementación proteica." Livestock Research for Rural Development 1(1): 1-23.

96. PETERS, M. 1991. "Plant Desing and Economics for Chemical Engineers.", United States.
97. POWLES, S. B. (1984). "Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light." *Plant Physiol* 35: 15-44.
98. QUINTANA, M. M. and M. FERNANDEZ. 2004. "Utilización de residual aviar como fuente de nutrientes en cultivos de microalgas." *Medisan* 8(3): 27-31.
99. REITH, J. 2005. "Grootschalige teelt van zeewierren in combinatie met offshore windparken in de Noordzee". ECN Biomassa.
100. Revista fitotecnia mexicana. 2012. "Efecto de la densidad celular de inoculación en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* CLV2 cultivada bajo condiciones mixotróficas". Disponible en: [revfitotecnia@hotmail.com](mailto:revfitotecnia@hotmail.com)
101. RICHMOMD, A. 1986c. "Microalgae of economic potential". In *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*, Richmond (Ed), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 199-243.
102. RIVERO, R. 2010. "Cultivo de *Chlorella* sobre residuales industriales para la producción de biocombustibles". Departamento de Biología. Universidad de Oriente.
103. ROMERO, T. y SUAREZ, G. 2001. "Resultados orientados al uso de *Chlorella* sp. cultivada en aguas residuales de la Industria Pesquera Cubana". Compacto. ISSN de II Taller Internacional CONyMA'2001.
104. ROMERO T. y OTERO, C. 2004. "*Chlorella* spp. desarrollada en los efluentes de la industria pesquera para alimentar *Brachionus plicatilis*". *Revista Electrónica de Veterinaria (REDVET)*. Especial Monográfico Acuicultura. Vol. V (2).
105. ROSABAL, J. & V., M. 1989. "Hidrodinámica y Separaciones Mecánicas."
106. SALAZAR GONZALEZ, M. 2006. "Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales". *Contactos* 59: 64-70.
107. SANT' ANNA, L., 1984. "Chlorococcales ( Chlorophyceae)". *Journal of Cramery of Germany*.B

108. SANTOS, M., MARTIN, F., DIANEZ, F., CARRETERO, M., GARCIA, M., TELLO, J., 2007, "Efecto de la aplicación de la vinaza de vino como biofertilizantes y en el control de enfermedades en el cultivo de pepinos"
109. SERRA, J. L. (2009). "Biotecnología con microalgas". Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad del País Vasco/EHU.
110. SHELEF, G., MORAIME, R., ORON, G. 1978. "Photosynthetic biomass production from sewage". *Agch. Hydrobiol. Beith. Ergebh. Limnol.*, 3-14
111. SIVALINGAM, P.M., 1983. "Evaluation of nutritive values of SCP *Chlorella vulgaris* propagated in palm oil mill effluent shedge". *Journal of Phycology*, 31, 71-75
112. SOEDER, C. and E. STENGEL, 1974. "Physico-chemical factors affecting metabolism and growth rate". *Algal Physiology and Biochemistry*. W. D. Stewart. University of California Press, Berkeley.
113. SEODER, C. (1980). "The scope of microalgae for food and feed". *Algae Biomass*. G. Shelef and C. Soeder. Amsterdam, Elsevier: 9-20.
114. SOEDER, C.J., HEGEWALD, E., 1988. *Scenedesmus*. In: M.A.B. Borowitzka, L.J (Ed.) "Micro-algal Biotechnology". Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp.59-84.
115. SOONG, P. 1980. "Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan, in *Algae Biomass*", Shelef and Soeder (Eds), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 97-113.
116. SOURNIA, A. 1974. "Circadian periodicities in natural populations of marine phytoplankton." *Adv. mar. Biol.* 12: 325-389.
117. SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. "Commercial applications of microalgae". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, p.87-96, 2006.
118. SOBRAL, A. F., LIRA, L.J., GUIMARES, V., 1988. "Efeito da suplementa aomineral da vinhaca na fertilizacao da cana soca". *Brasil Acucareiro*, 106, 11-15.

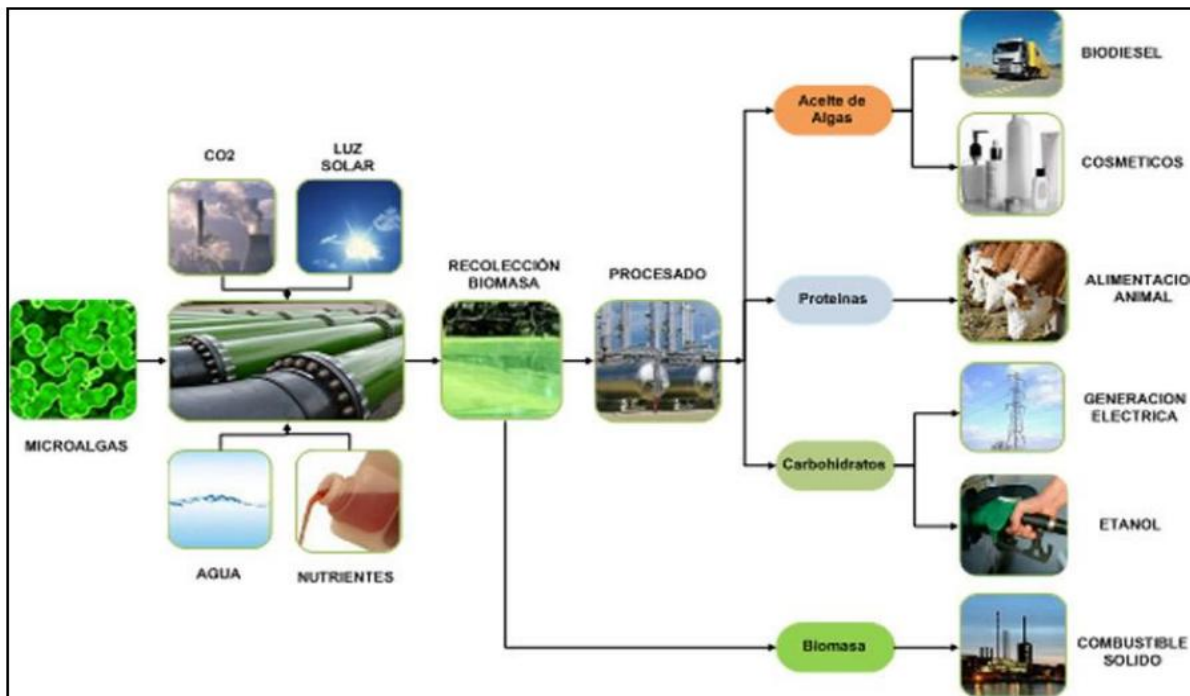
119. THOMASs, W. H. ; SEIBERT, D.N.R.; ALDEN, M. ; ELDRIDGE, P.; NEORli, A. ; GAINES, S. "Microalgae from desert saline waters as potential biomass producers, Prog".in Solar Energy, 6, 143-145.
120. TRAVIESO, L.; BENITEZ ECHEGOYENnÇ, F. 1998. "Cultivo de Arthrospira sp: del Laboratorio a Planta Piloto. Curso: Tecnología y aprovechamiento del cultivo heterotrófico de microalgas. Centro de Investigaciones Pesqueras". La Habana. Cuba.
121. UKELES, R. and W. E. ROSE (1976). "Observations on organic carbon utilization by photosynthetic marine microalgae." Marine Biology 37: 11-28.
122. ULRICH, G. 1985. "Diseño y Ecomía de los Procesos de Ingeniería Química.".
123. U.S. DOE. National Algal Biofuels Technology Roadmap. U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program. 2010. Disponible en: <http://biomass.energy.gov>
124. VAN DEN HOEK, C., MANN, D.G., JANS, H.M., 1995. "Algae. An Introduction to Phycology". Cambridge Univ. Press, Cambridge.
125. VENKATARAMAN, L.V., BECKER, E.W. 1985. "Biotenology and utilization of algae. The Indian experience". Ed. Sharada Press. New Delhi, India 257 pp.
126. VENKATARAMAN, L.V. 1986. "Blue-green algae as biofertilizar". In Handbook of Microalgal Mass Culture, Richmond (Ed), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 455-471.
127. VERMA, I., 1976. Toxicity of distillery waste to Puntius sophore (Ham) and Mystinvittatus (Bloch) (Piscu Cyprinidal Bagridal). Part 3. Bioassay studies and TLM determination. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 4, 574-550.
128. VIERA COSTA; J. A. "Produção de biodiesel a partir de microalgas. 1er Congreso Latinoamericano sobre Biotecnología Algal". Argentina 2004. ISBN N° 987-1130-32-5.
129. WELLBURN, A., 1994. "The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution". Journal of Plant Physiology, 144, 307-13.

130. WILDE, E. W. and J. R. BENEMAN (1993). "Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae." *Biotechnology Advances* 11: 781-812.
131. XU, H., X. MIAO and Q. WU (2006). "High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters." *Journal of Biotechnology* 126(4): 499-507.

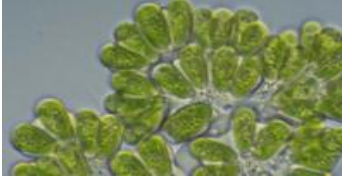
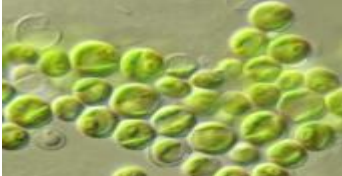
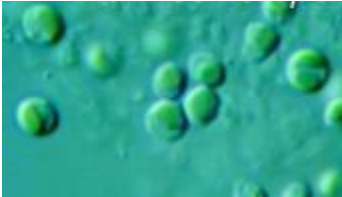
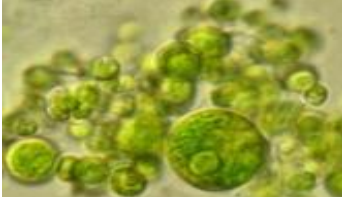

## Anexo 1. Diferencias entre el desarrollo extensivo e intensivo (Elisa, 2000)

	<b>Acuicultura intensiva</b>	<b>Acuicultura extensiva</b>
1. Medio físico, humano y económico	Máximo de productividad. Aplicación de tecnologías sofisticadas, con consumo de energía. Medios urbanizados o próximos a sociedades de consumo en donde el poder de compra es elevado.	Baja productividad. Costes de funcionamiento reducidos. Disponibilidad de aguas de buena calidad y en cantidades suficientes.
2. Especies a cultivar	Especies nobles que soportan fuertes densidades y condiciones de vida artificiales.	Todo tipo de especies.
3. Reproducción	Densidades elevadas. Necesidad de sistemas de producción ( <i>hatcheries</i> ).	Sistemas de producción por medios naturales o a partir de semillas/alevines obtenidos en <i>hatcheries</i> .
4. Alimentación	Se obtiene mediante aportes exógenos. Necesidades imperativas de alimentos compuestos equilibrados.	Raramente se aportan alimentos. Se pueden efectuar fertilizaciones orgánicas.

Anexo 2. Productos energéticos a partir de algas.



**Anexo 3: Contenido de aceite de algunas microalgas (Chisti, 2007).**

Microalga	Oil Content (% dry wt)	Figura
Botryococcus braunii	25-75	
Chlorella sp.	28-32	
Cryptocodinium cohnii	20	
Dunaliella primolecta	23	
Isochrysis sp.	25-33	
Monallanthus salina	>20	
Nannochloropsis sp.	31-68	
Neochloris oleoabundans	35-54	
Nitzschia sp.	45-47	

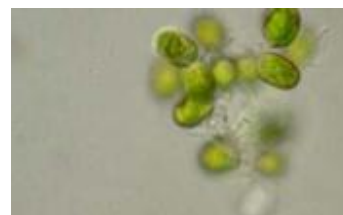
*Phaeodactylum*  
*tricornutum*

20-30



*Schizochytrium* sp.

50-77



*Tetraselmis suecica*

15-23

**Anexo 4. Lectura espectrofotométrica de las muestras a 665 nm, en el espectrofotómetro Genesys 10UV con un paso de luz de 1 cm, y un rango de resolución de 1 nm.**

<b>Muestras</b>	<b>Clorofila a (absorción)</b>	<b>Phaeo.</b>
C1	470-0.505	470-0.108
	653-0.715	653-0.320
	666-0.332	666-0.085
	750-0.000	750-0.025
C2	470-1.122	470-0.489
	653-1.195	653-0.487
	666-0.558	666-0.097
	750-0.010	750-0.020
C3	470-0.141	470-0.054
	653-0.161	653-0.122
	663-0.078	666-0.050
	750-0.001	750-0.009
C4	470-0.142	470-0.085
	653-0.170	653-0.132
	663-0.082	666-0.054
	750-0.003	750-0.011
C5	470-0.214	470-0.100
	653-0.262	653-0.198
	663-0.119	666-0.074
	750-0.005	750-0.015