



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Producción de biomasa microalgal en fotobiorreactores tubulares al aire libre utilizando fertilizantes como medio de cultivo.**

**Jeison André Guayara Artunduaga**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias

Medellín, Colombia

2018



# **Producción de biomasa microalgal en fotobiorreactores tubulares al aire libre utilizando fertilizantes como medio de cultivo.**

**Jeison André Guayara Artunduaga**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias-Biotecnología**

Director (a):

Alejandro Acosta Cárdenas, MSc

Codirector (a):

Arley David Zapata Zapata, PhD

Línea de Investigación:

Biotecnología

Grupo de Investigación:

Grupo de Biotransformación UdeA – Laboratorio de Procesos Biológicos Unal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias

Medellín, Colombia

2018



*Al Editor.*

*Gracias Editor por un mundo lleno de color, escrito con tal detalle que seguimos descubriendo mensajes ocultos a través de la ciencia, bien podría haber sido en escala de grises o pudiéramos percibir las cosas como simples ondas de choques y rebotes, no obstante el Editor lo hizo todo hermoso para el momento apropiado. Él sembró la eternidad en el corazón humano, aun cuando el hombre no alcanza a comprender todo el alcance de lo que el Editor ha hecho desde el principio hasta el fin.*

*Eclesiastés 3:1-11*

*A ese gran Editor, dedico este trabajo.*

*Jeison Guayara.*



## **Agradecimientos**

A la unidad del acuario de la Corporación Parque Explora por permitir el uso de las instalaciones, equipos y reactivos, así como a Paola Molina y Xiomara Gómez coordinadoras del laboratorio de aguas y laboratorio de microalgas del Parque Explora por su dirección en el diseño de montajes.

A mis tutores Alejandro Acosta y Arley Zapata por su compromiso, disposición y dirección de cada fase del proyecto.

Al grupo de Biotransformación por permitir el uso de las instalaciones, equipos y reactivos; y a sus integrantes por su buena disposición, y excelente ambiente de trabajo.

A mi compañera de maestría Lucia Verdugo por su apoyo incondicional y amistad.

A mis padres por imprimir ánimo en mi todos los días hasta terminar. A mis amigos y novia por entender mi compromiso con la universidad y ayudarme en todo.

A Dios por darme el conocimiento y la habilidad para realizar mis sueños.



## Resumen

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que requieren nutrientes relativamente simples, que permiten la generación de biomasa útil en la producción de lípidos y proteínas para la alimentación animal, aceites para biocombustibles, la producción de pigmentos, como sistemas de biorremediación de aguas residuales, entre otras aplicaciones. Sin embargo, los costos de producción son relativamente altos en comparación con otras fuentes de proteínas de origen vegetal o animal comunes en la producción de alimentos concentrados para la acuicultura. Hay varios factores que influyen en los costos de producción de la biomasa de microalgas, entre los que se encuentran el medio de crecimiento y la fuente de luz, el último para cultivos que utilizan lámparas eléctricas en entornos cerrados o de laboratorio. En este trabajo, la producción de biomasa de la microalga *Nannochloropsis* sp, se evaluó utilizando un fertilizante N-P-K en fotobiorreactores exteriores utilizando la luz solar como fuente de energía.

Para el cultivo al aire libre, se utilizaron 8 fotobiorreactores de columna de burbujeo hechos de fibra de vidrio, ubicados en la Sede de Estudios Ecológicos y Agroindustriales del SEEA de la Universidad de Antioquia en el municipio de Carepa Antioquia, Colombia. Se utilizó la microalga *Nannochloropsis* sp, se evaluaron las mezclas de aire y CO<sub>2</sub> con tres niveles (0,022; 3 y 6% de CO<sub>2</sub> en la corriente de aire) y se evaluó un fertilizante comercial tipo NPK como medio de cultivo (13-40-13), con tres niveles en concentraciones de 6,17; 12,34 y 18,51 mg Nitrógeno / L y como control, el medio de referencia Guillard F / 2 (12,34 mg nitrógeno / L).

Para los cultivos en el laboratorio, a una concentración de fertilizante de 18,51 mg Nitrógeno/L, se logró la mayor producción de biomasa y porcentaje de proteína (biomasa de 289 mg/L y 21% de proteína), valores que fueron más altos que los obtenidos con el medio de referencia. Sin embargo, para cultivos al aire libre, los mejores resultados se obtuvieron con el medio de referencia. Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones ambientales de luz y temperatura del municipio de Carepa-Antioquia,

logrando una producción de biomasa microalgal rica en proteínas, siendo mayor en el medio de referencia al comparar el fertilizante agrícola, 300 mg/L de biomasa con 22 % de proteína con el medio de referencia y 200mg/L con 23% de proteína con el fertilizante. Además, se concluye que es posible cultivar la biomasa de *Nannochloropsis* sp bajo las condiciones ambientales del municipio de Carepa y los costos de usar fertilizantes como medio de cultivo son 90 veces más bajos en comparación con el medio de referencia.

**Palabras Clave:** *Nannochloropsis* sp, columna de burbujeo, costos de producción, CO<sub>2</sub>, luz, temperatura, pH.

## Abstract

Microalgae are photosynthetic microorganisms that require relatively simple nutrients, which allow the generation of biomass useful in the production of lipids and proteins for animal feed, oils for biofuels, the production of pigments, among other applications as bioremediation systems for wastewater. However, production costs are relatively high compared to other protein sources of plant or animal origin common in the production of concentrated feeds for aquaculture. There are several factors that influence the production costs of microalgae biomass, among which are the growing medium and the light source, the latter for crops that use electric lamps in closed or laboratory environments. In this work, the biomass production of the microalga *Nannochloropsis* sp, was evaluated using an N-P-K fertilizer in outdoor Photobioreactors using sunlight as an energy source.

For outdoor culture, 8 bubble column photobioreactors made of glass fiber were used, located in the Headquarters of Ecological and Agroindustrial Studies of the SEEA of the University of Antioquia in the municipality of Carepa Antioquia, Colombia. The microalga *Nannochloropsis* sp was used, the air and CO<sub>2</sub> mixtures were evaluated with three levels (0.022, 3 and 6% of CO<sub>2</sub> in the air stream) and a commercial NPK type fertilizer was evaluated as a culture medium (13-40-13), with three levels in concentrations of 6.17; 12.34 and 18.51 mg Nitrogen / L and as control, the Guillard reference medium F/2 (12.34 mg nitrogen / L).

For the cultures in the laboratory, at a fertilizer concentration of 18.51 mg Nitrogen / L, the highest biomass production and the percentage of protein (biomass of 289 mg / L and 21% protein) were achieved, values that were higher than those obtained With the reference medium. However, for outdoor cultures, the best results were obtained with the reference medium. The experiments were carried out under environmental conditions of

light and temperature of the municipality of Carepa-Antioquia, achieving a microalgae production of protein-rich biomass, being higher in the reference medium when comparing the agricultural fertilizer, 300 mg / l of biomass with 22% protein with the reference medium and 200mg / L with 23% protein with the fertilizer. In addition, it is concluded that it is possible to grow the biomass of *Nannochloropsis* sp under the environmental conditions of the municipality of Carepa and the costs of using fertilizers as a culture medium are 90 times lower in comparison with the reference medium.

**Keywords:** *Nannochloropsis* sp, bubble column, production costs, CO<sub>2</sub>, light, temperature, pH.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Marco teórico</b> .....	<b>7</b>
1.1 Importancia de las microalgas en la piscicultura .....	7
1.2 Generalidades microalgas .....	7
1.3 <i>Nannochloropsis</i> .....	8
1.4 Factores que afectan el crecimiento .....	9
1.5 Efecto de la concentración de CO <sub>2</sub> sobre la producción de biomasa microalgal	11
1.6 Sistemas de producción de microalgas.....	12
1.6.1 Sistemas abiertos.....	12
1.6.2 Cerrados .....	14
1.7 Medios de cultivo .....	15
1.7.1 Medios de cultivo convencionales .....	15
1.7.2 Medios de cultivo alternativo .....	16
1.8 Producción de biomasa microalgal en fotobiorreactores al aire libre .....	19
1.8.1 Luz.....	19
1.8.2 Temperatura .....	21
1.9 Producción de microalgas al aire libre .....	21
1.10 Área de estudio: Municipio de Carepa-Antioquia. ....	24
1.11 Costos de producción de biomasa microalgal .....	25
<b>2. Metodología</b> .....	<b>27</b>
2.1 Efecto de la concentración de CO <sub>2</sub> en la producción de biomasa .....	27
2.2 Cuantificación de las variables de respuesta .....	28
2.2.1 Concentración de biomasa, proteína y carbohidratos.....	28
2.2.2 Evaluación de la intensidad lumínica en los cultivos al aire libre .....	29
2.3 Evaluación de un fertilizante agrícola como medio de cultivo.....	30
2.4 Cultivos de biomasa de <i>Nannochloopsis</i> sp al aire libre.....	31
2.5 Evaluación de los costos de medio de cultivo .....	33
2.6 Análisis estadísticos .....	33



## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura. 1.</b> Interacciones de las microalgas en cuerpos de agua natural (Guayara, 2017) .....	10
<b>Figura. 2.</b> Equilibrios trifásicos en el sistema CO <sub>2</sub> /agua (Mook 2002). .....	11
<b>Figura 3.</b> Sistemas de cultivos microalgal. Sistemas abiertos (A) y sistemas cerrados (B, C y D). a) Cultivo tipo carrusel (High Rate Algal Ponds; HRAP); b) fotobiorreactor en paneles; c) y d) fotobiorreactores tubulares (Hernández and Labbé 2014). .....	13
<b>Figura 4.</b> Crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> en un fotobiorreactor de 3 L; comportamiento del consumo de nitrato y amino (Guayara, Henao, and Acosta 2014) ...	18
<b>Figura 5.</b> Ubicación geográfica de la Sede de Estudios Ecológicos y Agroindustriales de la Universidad de Antioquia (Tulenapa) cerca del municipio de Carepa – Antioquia (Tomado de Google maps).....	24
<b>Figura. 6</b> Diagrama del diseño estadístico unifactorial para evaluar el efecto de la concentración de CO <sub>2</sub> sobre la producción de biomasa microalgal .....	28
<b>Figura. 7</b> Diagrama del diseño estadístico unifactorial para evaluar diferentes concentraciones de fertilizante teniendo como medio control F/2 de Guillard. ....	31
<b>Figura 8.</b> Diagrama del diseño de cultivo al aire libre empleando medio control F/2 de Guillard y fertilizante agrícola a 18,6 mg de N/L, evaluados en las condiciones ambientales de Carepa-Antioquia en la producción de biomasa microalgal. Puntos de muestreo de intensidad de luz. ....	32
<b>Figura 9.</b> Fotobiorreactores al aire libre en columnas de burbujeo de 250L y botellones de 20 L de la microalga <i>Nannochloropsis</i> sp en la Sede de Tulenapa Carepa-Antioquia.	33
<b>Figura 10.</b> Concentración de biomasa de <i>Nannochloropsis</i> sp producida al día 4 y 8, en diferentes concentraciones de CO <sub>2</sub> en la corriente gaseosa (0,002; 3 y 6%). .....	35
<b>Figura. 11</b> Seguimiento de pH de los cultivos de <i>Nannochloropsis</i> sp crecidos en diferentes concentraciones de CO <sub>2</sub> . .....	35
<b>Figura. 12</b> Crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp en diferentes concentraciones del fertilizante agrícola (a: 6,23; b: 12,36; c: 18,72 mg de Nitrógeno/L) y F/2 de Guillard como medio de referencia (12,36 mg de Nitrógeno/L) en el día 4 y 8. ....	38
<b>Figura. 13</b> Crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp en fotobiorreactores de 240 Litros, en fertilizante y medio de referencia F/2 de Guillard e intensidad de luz promedio por día...41	41
<b>Figura. 14</b> Dinámicas de pH del cultivo de <i>Nannochloropsis</i> sp, en los fotobiorreactores al aire libre en diferentes horas del día. ....	42
<b>Figura. 15</b> Dinámica de la intensidad lumínica media perpendicular (I <sub>5</sub> ), en la superficie del reactor (I <sub>o</sub> ) e interna (I <sub>a</sub> ) de los fotobiorreactores entre las 7 - 18 horas, durante los días de cultivo. ....	44

---

<b>Figura. 16</b> Dinámicas de las temperatura externa, en superficie e interna y humedad relativa entre las 6 - 18 horas.....	45
<b>Figura. 17</b> Porcentaje de proteína y carbohidratos de la biomasa de <i>Nannochloropsis</i> sp. obtenida a partir del fertilizante agrícola y el medio comercial F/2 de Guillard, en fotobiorreactores al aire libre. ....	46
<b>Figura.18</b> absorbancia de cultivos de <i>Nannochloopsis</i> sp a diferentes concentraciones celulares, en longitudes de onda entre 400 a 700 nm. ....	62
<b>Figura.19</b> puntos de muestreo de intensidad lumínica para los reactores al aire libre ....	64
<b>Figura. 20.</b> Crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp en 3 concentraciones de biomasa microalgal. ....	67
<b>Figura. 21.</b> Crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp en diferentes concentraciones de fertilizante. ....	72
<b>Figura. 22.</b> Crecimiento de <i>Nannochloropsis</i> sp en en F/2 de Guillard y fertilizante, al aire libre. ....	76

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Especies de microalga comercialmente cultivadas a gran escala para la producción de biomasa (Moheimani et al. 2015). .....	8
<b>Tabla 2.</b> Comparación entre los sistemas de producción de microalgas abiertos y cerrados (Moheimani et al. 2015). .....	15
<b>Tabla 3.</b> Productividades alcanzadas en bajo sistemas de piscinas abiertas (Bouterfas, Belkoura, and Dauta 2002). .....	22
<b>Tabla 4.</b> Productividades obtenidas bajo sistemas de fotobiorreactor(Ruiz 2011). .....	23
<b>Tabla 5.</b> Tasas de crecimiento, porcentaje de proteína y carbohidratos de la biomasa obtenida en diferentes concentraciones de CO <sub>2</sub> . .....	36
<b>Tabla 6.</b> Tasa de crecimiento, porcentaje de proteína y carbohidratos de la biomasa obtenida en diferentes concentraciones de fertilizante (Tratamientos a, b y c) y en el medio control de referencia F/2 de Guillard. ....	39
<b>Tabla 7.</b> Análisis de costos del medio de cultivo para la producción de biomasa microalgal. ....	47
<b>Tabla 8.</b> Constante de extinción de <i>Nannochloropsis</i> sp, en longitudes de onda entre 400 y 700nm .....	63



## Introducción

Colombia es un país con gran cantidad de cuencas hidrográficas; su localización superficial, así como sus formas de elevación y los regímenes climáticos particulares, lo han ubicado entre los países con mayor riqueza en recursos hídricos en el mundo (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial 2010); posicionando a su vez a la pesca como una actividad importante para el país, ya que miles de pescadores marinos y ribereños continentales, logran con ella garantías para su seguridad alimentaria (OCDE 2016).

Sin embargo la disponibilidad del recurso es cada vez menor, ya que las poblaciones donde se llevan a cabo las actividades pesqueras están ubicadas en regiones con baja oferta hídrica, y presentan problemas como la sobre-pesca y la contaminación ambiental, lo cual ha terminado en producciones con tendencias decrecientes en las últimas décadas, llevando a los pescadores a buscar otras alternativas de producción. La piscicultura ha sido la más destacada de las soluciones, ya que eleva el consumo per-cápita, incrementa la generación de empleo en el campo, mejora las condiciones de vida de los productores y de su núcleo familiar. (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial 2010)(OCDE 2016).

El Golfo de Urabá tiene una capacidad de 3 toneladas de pescado al mes (Olga and Rendón 2016), sin embargo se ha encontrado que factores como la invasión del Pez León, uso extractivo de recursos en zonas no protegidas, conflictos entre pescadores artesanales e industriales y la seguridad de los pescadores respecto al clima agresivo en ciertas épocas del año, ha generado la necesidad de hacer planes de ordenamiento pesquero en donde se propone la piscicultura como parte de la solución (OCDE 2016).

Las microalgas (organismos unicelulares de metabolismo fotosintético) tienen un alto contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos, y otros productos de valor agregado, que son base nutricional del zooplancton y varias especies de importancia comercial (Codina,

García, and Barón 2012). En piscicultura, la cría de los peces es la etapa que presenta las mayores dificultades para la producción masiva, ya que los alevinos (primera etapa de los peces) poseen bocas muy pequeñas, y requieren ser alimentados por crustáceos microscópicos o microalgas (alimento vivo) (Piña et al. 2007), que suplen compuestos importantes en el desarrollo y supervivencia de los alevinos como ácidos grasos esenciales, altos niveles de proteína, vitaminas, minerales y enzimas. No obstante hacen falta tecnologías de fácil aplicación, bajos costos y fácil manejo, que sean transferibles a campesinos y pescadores, que buscan en la piscicultura una alternativa económica. (Prieto et al. 2006)

Aunque se han utilizado suplementos alimenticios artificiales para nutrir los estadios larvarios de los peces, estos no han sido prácticos en la sobrevivencia de los mismos, dejando al alimento vivo como parte indispensable para el desarrollo de la piscicultura. Otras técnicas como liofilización, micro capsulas o congelación del alimento vivo han resultado en costos elevados no sostenibles. Es por tanto la optimización y estandarización de los cultivos de fitoplancton (microalgas) y zooplancton (protistas y crustáceos microscópicos) para la producción industrial, la solución más directa a la demanda constante de alimento vivo que exige la piscicultura. (Córdova et al. 2010).

La inclusión de microalgas en el alimento para piscicultura varía según la especie a producir. Para moluscos y bivalvos las microalgas encuentran una participación en el alimento durante todo el ciclo de vida, mientras que para otros cultivos como los peces marinos, la participación se da durante periodos cortos, asociados a la cría. Las especies que han sido reportadas con potencial nutritivo para alimentación en piscicultura son: *Isochrysis* y *Pavlova* pertenecientes a las Prymnesiofitas; la Eustigmatofita *Nannochloropsis*; las Bacillariofitas *Phaeodactylum*, *Chaetoceros* y *Thalassiosira*; la Prasinofita *Tetraselmis* y la Criptofita *Rhodomonas* (Pedro and Hors 2014).

Las microalgas han sido estudiadas en las últimas décadas, poniendo en evidencia que son varios los factores que determinan su crecimiento. Estos factores son de tipo ambiental (luz y temperatura), de operación (pH, CO<sub>2</sub> y nutrientes), biológicos (zooplancton herbívoros y patógenos de algas) y de producción (medios de cultivo y sistemas de producción) (Lee 2013).

Las investigaciones presentan dos focos de estudio para reducir los costos en el cultivo microalgal, la búsqueda de medios alternativos de menor costo y el diseño de sistemas de cultivos de mayor eficiencia energética. En el primer punto los fertilizantes agrícolas han llamado la atención como medio de cultivo alternativo, ya que poseen los nutrientes que requieren las microalgas a un menor costo que los medios de cultivos comerciales, alcanzando tasas de crecimiento mayores o iguales a las obtenidas con medios convencionales (Valenzuela-Espinoza et al. 2005)(Piña et al. 2007).

En cuanto a los sistemas de producción pueden clasificarse en piscinas abiertas y fotobiorreactores. El primer sistema consiste en estanques al aire libre donde la luz solar constituye la fuente de energía para los cultivos de microalgas (Chiu et al. 2015). Esta tecnología es de fácil aplicación, ya que los requerimientos de construcción, energía, y mantenimiento son bajos comparados con los fotobiorreactores, no obstante es deficiente en producciones a gran escala, debido a que en este tipo de sistemas, variables de cultivo como pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, temperatura, intensidad de luz y en algunos casos agitación son controladas por el ambiente, llegando a ser una producción inestable, de baja densidad y propensa a contaminarse (Mulumba and Farag 2012).

Los sistemas de fotobiorreactores en cambio están diseñados para procesos industriales, ya que en estos se controlan las variables de cultivo que las piscinas dejan al azar, lo que permite no solo estandarizar sino optimizar el proceso, esto por ser cerrados. Cultivos de alta densidad y biomasa de calidad con características específicas son las ventajas de este tipo de sistema, debido a que se pueden hacer cultivos monoalgales, punto importante para la industria cosmética y farmacéutica que busca productos definidos (Ruiz 2011).

Pese a la gran cantidad de publicaciones acerca de los factores de crecimiento de microalgas y los sistemas de producción, son pocas las que manejan sistemas aplicables o transferibles desde un punto de vista económico y operacional a comunidades campesinas para el cultivo de peces, como las del golfo de Urabá. Por lo cual se hace necesario investigar bajo las condiciones de ambientales de Urabá, el crecimiento de microalgas en medios de cultivos alternativos como los fertilizantes agrícolas.

Dado lo anterior un sistema de producción que utilice la energía solar como los sistemas abiertos, bajo una estructura cerrada como los fotobiorreactores, puede ser una alternativa que supla las necesidades de fuentes proteicas de origen microbiano cultivado en medios de cultivo de bajo costo. En este sentido se propone como objetivo de esta investigación, evaluar la producción de biomasa microalgal de *Nannochloropsis* sp en fotobiorreactores al aire libre, dejando las condiciones de temperatura y luz, a expensas del medio ambiente, y el uso de fertilizantes como medio de cultivo.

## Objetivos

### General

Evaluar la concentración de biomasa, y porcentaje de proteína, obtenida a partir de la microalga *Nannochloropsis* sp, empleando un fertilizante agrícola como medio de cultivo, al aire libre en el Urabá antioqueño, en fotobiorreactores tipo columna de burbujeo.

### Específicos

- Establecer in vitro, las mejores condiciones de suministro de CO<sub>2</sub> a la cual se obtiene mayor concentración de biomasa y porcentaje de proteína.
- Establecer in vitro, las mejores condiciones de concentración de fertilizante a la cual se obtiene mayor concentración de biomasa y porcentaje de proteína.
- Evaluar in situ, la concentración de biomasa y porcentaje de proteína obtenida a partir de *Nannochloropsis* sp, en fotobiorreactores, tipo columna de burbujeo, al aire libre, empleando las mejores condiciones de CO<sub>2</sub> y fertilizante, en el Urabá Antioqueño.



# **1. Marco teórico**

## **1.1 Importancia de las microalgas en la piscicultura**

En piscicultura, la cría de los peces es la etapa que presenta las mayores dificultades para la producción masiva, ya que los alevinos (primera etapa de los peces) poseen bocas muy pequeñas, y requieren ser alimentados por crustáceos microscópicos o microalgas (alimento vivo), que suplen compuestos importantes en el desarrollo y supervivencia de los alevinos como ácidos grasos esenciales, altos niveles de proteína, vitaminas, minerales y enzimas (Prieto et al. 2006).

Aunque se han utilizado suplementos alimenticios artificiales para nutrir los estadios larvarios de los peces, estos no han sido prácticos en la sobrevivencia de los mismos, dejando al alimento vivo como parte indispensable para el desarrollo de la piscicultura. Otras técnicas como liofilización, micro capsulas o congelación del alimento vivo han resultado en costos elevados no sostenibles. Es por tanto la optimización y estandarización de los cultivos de fitoplancton (microalgas) y zooplancton (protistas y crustáceos microscópicos) para la producción industrial, la solución más directa a la demanda constante de alimento vivo que exige la piscicultura (Córdova et al. 2010).

## **1.2 Generalidades microalgas**

Las microalgas son organismos fotosintéticos microscópicos, capaces de obtener a partir de fuentes inorgánicas de carbono, nitrógeno, fósforo y luz solar, biomasa (carbohidratos, lípidos y proteínas) (Silva et al. 2015). Su metabolismo puede compararse con las plantas, sin embargo las tasas de crecimiento difieren, ya que las microalgas son capaces de asimilar los nutrientes y generar biomasa más rápidamente, aun en espacios limitados, obteniendo tiempos de duplicación más bajos y productividades mayores, sin la necesidad de amplios terrenos. Son estas características las que han llamado la atención de las investigaciones que buscan reducir niveles nocivos de CO<sub>2</sub> en la atmósfera al incorporarlo en biomasa microalgal, y captar nutrientes del agua que impidan la eutrofización de cuerpos de agua, a la vez que se obtienen productos de valor agregado,

como biocombustibles, aceites, pigmentos, alimento, fertilizantes etc (Silva et al. 2015)(Chiu et al. 2015)(Wu, Yu, and Hu 2015).

Se estima que hay entre 100 mil y 1 millón de especies de microalgas, no obstante, solo una pequeña parte es cultivable, y de estas solo una parte pueden ser cultivadas a grandes escalas. La tabla 1 muestra algunas de las especies comerciales más importantes (Moheimani et al. 2015).

**Tabla 1.** Especies de microalga comercialmente cultivadas a gran escala para la producción de biomasa (Moheimani et al. 2015).

Microalga	Especies
<b>Chlorophyceae</b>	<i>Neochlorisoleo abundans</i> ; <i>Scenedesmus dimorphus</i> ; <i>Botryococcus braunii</i> ; <i>Dunaliella tertiolecta</i> ; <i>Nannochloris</i> sp.; <i>Chlorella protothecoides</i> ; <i>Ankistrodesmus braunii</i> .
<b>Euglenophyceae</b>	<i>Euglena gracilis</i>
<b>Prasinophyceae</b>	<i>Tetraselmis</i> spp. (i.e <i>Tchuii</i> y <i>T. suecica</i> )
<b>Haptophyceae</b>	<i>Chrysolitacarterae</i> ; <i>Isochrysisgalbana</i>
<b>Eustigmatophyceae</b>	<i>Nannochloropsis</i> spp. (e.g. <i>N. salina</i> , <i>N. oculata</i> , <i>N. gaditana</i> )
<b>Bacillariophyceae (diatomeas)</b>	<i>Cyclotella cryptica</i> ; <i>Chaetoceros</i> sp.; <i>Skeletonema</i> sp.
<b>Cyanobacteria (blue-greenalgae)</b>	<i>Arthrospira (spirulina) platensis</i>

### 1.3 *Nannochloropsis*

*Nannochloropsis* es un género microalgal perteneciente al grupo Eustigmatofito, caracterizado células esféricas con un tamaño entre 2 a 4  $\mu\text{m}$ . Su crecimiento es relativamente rápido a comparación de otras microalgas y su biomasa presenta características bromatológicas útiles para la alimentación animal y la producción de biocombustibles. Barbara Howe en 2012, evaluó la biomasa obtenida a partir de *Nannochloropsis oculata*, estimando una concentración de aceite de 20% útil para producción de biocombustible, y un 30% de proteína, presente aun después de la extracción de aceite, que puede utilizarse para alimentación animal (Howe 2012). Las especies pertenecientes al género *Nannochloropsis* presentan un color verde durante su

fase exponencial, que puede cambiar a naranja rojizo en cultivos viejos, cuando se exponen a intensidades altas de luz, o condiciones deficientes de nitrógeno. Al igual que el resto de las Eustigmatophyceae, el género *Nannochloropsis* presenta clorofila a (diferenciándose de otros géneros al carecer de clorofila b y c),  $\beta$ -caroteno, violaxantina como carotenoide mayoritario y vaucherixantina, más pigmentos secundarios (Lubián 1982).

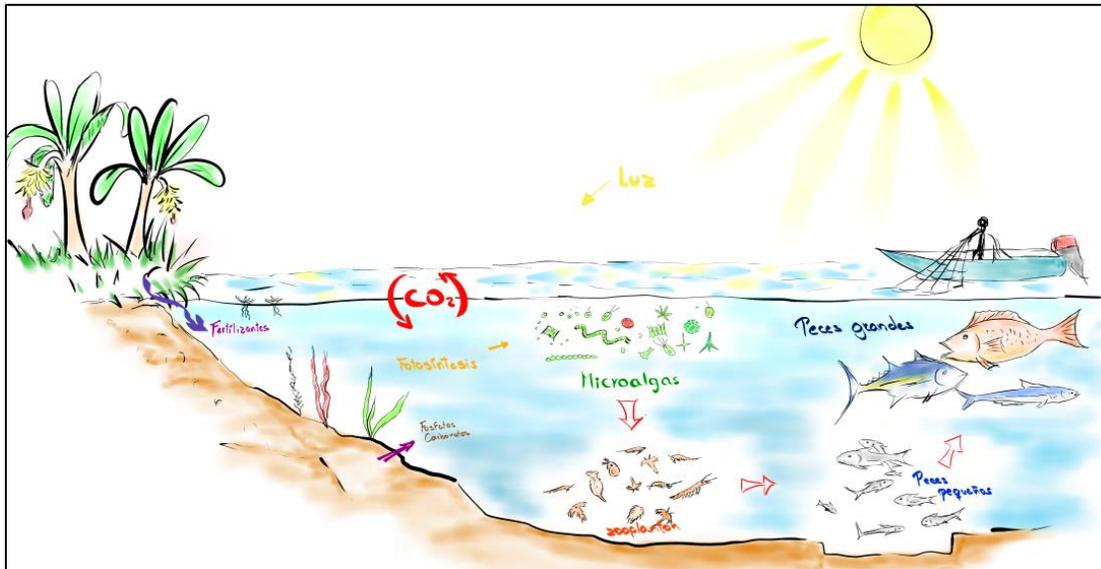
Los requerimientos nutricionales para las especies pertenecientes a este género no son muy exigentes. Las fuentes de nitrógeno son amplias y abarcan a nitritos, nitratos, amonio y urea, creciendo aun en concentraciones bajas (0,5 mg de nitrógeno/L). Para obtener un buen crecimiento no es necesaria la adición de vitaminas y crecen en rangos amplios de temperatura y salinidad, y responden bien a radiaciones de luz altas, tal vez debido a la presencia de una sola clorofila (Lubián 1982). Debido a estas características se han realizado estudios de esta microalga en diferentes medios de cultivos, como gallinaza, fertilizantes (Campaña-Torres et al. 2012), aguas residuales, etc; en diferentes condiciones ambientales (Valdés et al. 2012): y para diferentes propósitos como producción de lípidos (Khoeyi, Seyfabadi, and Ramezanpour 2012) y proteínas para alimentación animal (Fernanda and Gutiérrez 2017), producción de aceites para biocombustibles (Sanchez-duarte et al. 2018), producción de pigmentos (Henriques, Silva, and Rocha 2007) y como sistemas biorremediadores de aguas residuales.

## 1.4 Factores que afectan el crecimiento

Las microalgas han sido estudiadas en las últimas décadas, poniendo en evidencia que son varios los factores que determinan su crecimiento. Estos factores son de tipo ambiental (tipo y cantidad de luz, y temperatura), de operación (pH, CO<sub>2</sub> y nutrientes), biológicos (zooplancton herbívoros y patógenos de algas) y de producción (sistemas de producción) (Lee 2013).

Las células algales requieren elementos en proporciones relativamente fijas para poderse reproducir. Los nutrientes pueden ser categorizados en dos grupos, macronutrientes requeridos en altas concentraciones y que son utilizados para la formación de la estructura celular, y micronutrientes requeridos en bajas cantidades con un papel metabólico específico en la fisiología de las microalgas. Estos últimos son el hierro, boro, cobre, molibdato, zinc, manganeso y silicio en el caso de las diatomeas, en su mayoría

metales, que se precipitan con facilidad en medios salinos, por lo cual se hace necesario de agentes quelantes para solubilizarlos (Romo, 2002).



**Figura. 1.** Interacciones de las microalgas en cuerpos de agua natural (Guayara, 2017)

Para las microalgas los macronutrientes son carbono usualmente en forma de carbonatos o dióxido de carbono, el nitrógeno asimilado como amonio o nitrato y el fósforo incorporado como fosfatos. Estos se encuentran distribuidos en la célula como aminoácidos en el caso del nitrógeno, fosfolípidos para el fósforo y en la obtención de energía por parte del carbono (Romo 2002). En cultivos donde se buscan obtener productos específicos, los medios son suplementados con otros nutrientes, como la glucosa, utilizada para la producción de lípidos en cultivos heterotróficos (Martínez 2012).

Los medios de cultivos comerciales como el F/2 de Guillard, presentan los micronutrientes y macronutrientes necesarios para obtener un buen crecimiento de las microalgas, sin embargo son económicamente inviables cuando se trata de producciones industriales, por lo cual los estudios han dirigido su atención a la búsqueda de medios de cultivo alternativos (Ortega-Salas and Reyes-Bustamante 2012).

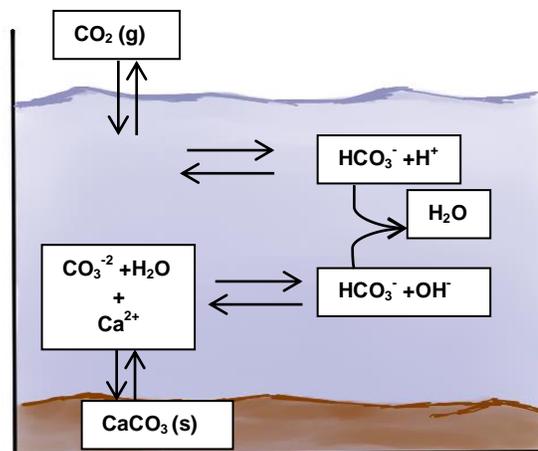
La mayoría de los medios alternos aunque no poseen todos los requerimientos nutricionales contienen los macronutrientes, con lo cual se alcanzan rendimientos de

producción de biomasa similares a los medios comerciales, no obstante el contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos puede variar (Moheimani et al. 2015).

## 1.5 Efecto de la concentración de $\text{CO}_2$ sobre la producción de biomasa microalgal

La fuente de carbono generalmente utilizada por las microalgas es el  $\text{CO}_2$  (bajo condiciones de cultivo fotoautotróficas), el cual puede ser tomado directamente del aire, aunque también pueden utilizar otras fuentes de carbono inorgánico como el bicarbonato de sodio. El dióxido de carbono puede ser suministrado al medio de cultivo directamente del aire, que tiene 0,022% o por inyección en el sistema de burbujeo, ya sea continuo o por pulsos (Barajas 2010).

Una vez el  $\text{CO}_2$  ingresa a un medio acuoso se disocia en ácido carbónico inicialmente, el cual forma un equilibrio con el ión carbonato, que puede provenir en los cuerpos de agua natural del lavado de las rocas calizas, o en los cultivos de microalgas de bicarbonato de sodio (figura. 2).



**Figura. 2.** Equilibrios trifásicos en el sistema  $\text{CO}_2$ /agua (Mook 2002).

El pH es entonces modificado por las concentraciones de estos compuestos, elevándose cuando se aumenta la concentración de carbonatos, y disminuyendo cuando se incorpora  $\text{CO}_2$  al medio. Las microalgas en general presentan rangos de pH entre 7 a 9, por lo que un exceso de  $\text{CO}_2$  puede generar inhibición en el crecimiento por disminución de pH (Mook 2002).

Por otra parte, las microalgas al igual que la mayoría de las plantas hacen fotosíntesis C3, en donde la enzima RUBISCO interviene en el proceso de fijación de CO<sub>2</sub>. Cuando la concentración de CO<sub>2</sub> en los cloroplastos cae por debajo de 50 ppm, el catalizador rubisco que ayuda a fijar el carbono, comienza a fijar oxígeno en su lugar, lo que supone un gasto de la energía recogida de la luz, lo cual se denomina fotorespiración (García 2009).

Estudios en el crecimiento microalgal muestran que varias especies de microalgas pueden crecer bien bajo flujo de aire con hasta 15% de CO<sub>2</sub> (García 2009), no obstante las mayoría de las microalgas de interés comercial desarrollan sus mayores tasas de crecimiento entre 1 y 5% de CO<sub>2</sub> y concentraciones por encima del 5% afectan a su velocidad de crecimiento (Cabello, Morales, and Revah 2017; Cheng et al. 2006; Verma et al. 2018). Para *Nannochloropsis* sp, Verma y colaboradores estimaron la mayor tasa de crecimiento a 3,42% v/v de CO<sub>2</sub>.

## 1.6 Sistemas de producción de microalgas

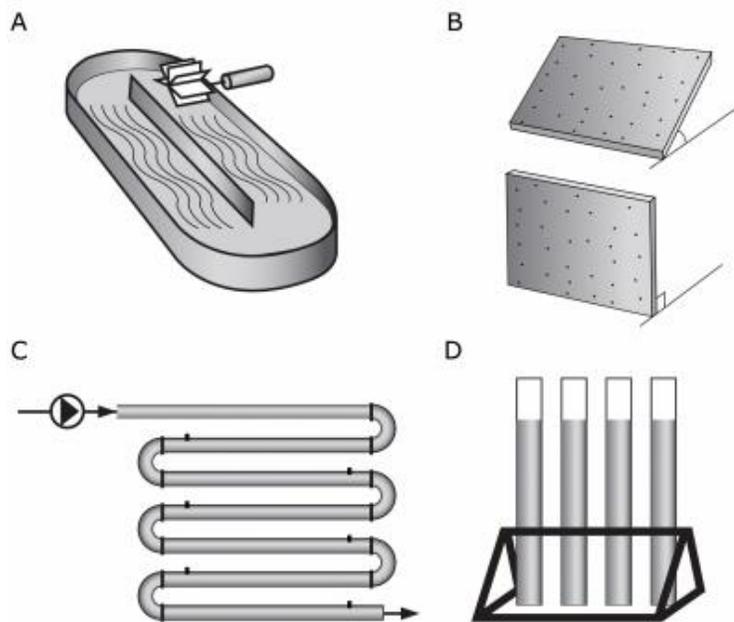
Dentro de los sistemas desarrollados para la producción de microalgas 2 son destacados, abiertos y cerrados. El primer sistema consiste en estanques al aire libre donde la luz solar constituye la fuente de energía para los cultivos de microalgas. Estos estanques pueden tener tres tipos de configuraciones. Estanques en desnivel, donde la mezcla se da por bombeo y gravedad. Estanques circulares impulsados por un brazo giratorio y estanques en circuitos cerrados de recirculación impulsados por un sistema de ruedas y paletas (figura 3) (Mulumba&Farag, 2012).

### 1.6.1 Sistemas abiertos

El sistema de piscinas abiertas es una tecnología de fácil aplicación, ya que los requerimientos de construcción, energía, y mantenimiento son bajos comparados con los fotobiorreactores, no obstante, es deficiente (bajas productividades) en producciones a gran escala, debido a que en este tipo de sistemas variables de cultivo como pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, temperatura, intensidad de luz y en algunos casos con agitación. Dichas variables en gran medida son controladas por las condiciones ambientales, llegando a ser una

producción inestable, de baja densidad y propensa a contaminarse. A su vez la biomasa tiende a sedimentarse a lo largo del proceso, lo que dificulta la recolección del alga, problema que se incrementa al evaporarse el agua, cuando se tratan de sistemas construidos en lugares de altas temperaturas. No obstante, en cultivos de *Chlorella* se han alcanzado rendimientos de  $25 \text{ g m}^{-2}$  por día. (Mulumba&Farag, 2012)

Los sistemas abiertos pueden ser clasificados de acuerdo al mecanismo de agitación. Encontramos así sistemas de paletas donde la agitación se da por una fuerza mecánica casi siempre al inicio del cultivo, sistemas de capa fina, que son sistemas largos donde el medio de cultivo avanza por gravedad y al final se cosecha la microalga, y sistemas circulares donde la agitación es dada por paletas radiales.



**Figura 3.** Sistemas de cultivos microalgal. Sistemas abiertos (A) y sistemas cerrados (B, C y D). a) Cultivo tipo carrusel (High Rate Algal Ponds; HRAP); b) fotobiorreactor en paneles; c) y d) fotobiorreactores tubulares (Hernández and Labbé 2014).

## 1.6.2 Cerrados

Los sistemas cerrados controlan las variables de cultivo que los sistemas abiertos dejan al azar, lo que permite no solo estandarizar sino optimizar los procesos, al permitir obtener resultados reproducibles. Cultivos de alta densidad y biomasa de calidad con características específicas son las ventajas de este tipo de sistema, debido a que se pueden hacer cultivos monoalgales, punto importante para la industria cosmética y farmacéutica que busca productos definidos (Ruiz 2011). Los sistemas cerrados pueden ser de tipo tubular, plano o de columna.

Tanto los sistemas tubulares como planos son adecuados para cultivos en el exterior por su alta relación área iluminada/volumen ( $S/V$ , Superficie/Volumen) del reactor. Estos sistemas comúnmente llamados fotobiorreactores (FBR) pueden presentar espacios de acumulación de oxígeno, generando así crecimiento microalgal lento, además cuando son ubicados al aire libre pueden ocurrir fenómenos de fotoinhibición cuando son expuestos a altas intensidades de luz solar. Los sistemas tubulares están conformados por tubos de poco diámetro transparentes orientados generalmente en forma horizontal, en los cuales se busca mayor transferencia de luz al cultivo, los sistemas planos son paneles inclinados. Estos dos sistemas presentan mayor complejidad en operación y limpieza.

Los fotobiorreactores utilizados comúnmente son los de tipo columna de burbujeo, en estos la agitación es producida por las burbujas que ascienden por el tubo, lo que permite aumentar la frecuencia de intercambio de las células desde el centro menos iluminado a la superficie más iluminada, movimiento que mejora la irradiancia incidente, y por tanto el rendimiento celular (Chiu et al. 2015)(gallardo Rodriguez 2009).

Otros diseños de fotobiorreactores son los tipos tanque agitado y/o aireados, en los que la agitación esta mediada por un agitador neumático o mecánico, que involucra a su vez paletas y aspersores, que según el diseño de la estructura producen diferentes tipos de flujo al interior del reactor. Sin embargo estos sugieren un incremento de costo y energía (Ruiz 2011). En la tabla 2 se resumen las características de este tipo de sistemas de producción microalgal (Moheimani et al. 2015).

**Tabla 2.** Comparación entre los sistemas de producción de microalgas abiertos y cerrados (Moheimani et al. 2015).

Parámetro	Piscinas abiertas	Fotobiorreactores cerrados
Eficiencia de la luz	Muy bueno	Excelente
Control de temperatura	Ninguna	Bueno
Transferencia de gas	Pobre	Alto
Oxígeno producido	Alto	Muy alto
Hidrodinámica	Baja	Alta
Superficie/radio de volumen	Moderado	Alto
Control de especies	Difícil	Factible
Esterilidad	Ninguna	Factible por periodos cortos
Productividad volumétrica	Baja	Alta
Costo	Bajo	Alto

## 1.7 Medios de cultivo

### 1.7.1 Medios de cultivo convencionales

Se han desarrollado medios de cultivos basados en las formulas elementales de las microalgas, incorporando sales en proporciones específicas, además de vitaminas, y en algunos casos antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias. Un medio comúnmente utilizado para el cultivo de microalgas de agua salada es el F de Guillard y Ryther (1962). La fuente de nitrógeno para este medio, es aportada por el nitrato de sodio, por solubilidad y poca evaporación. Presenta también vitaminas como la B<sub>12</sub>, la cual interviene en la replicación del ADN y por ende en la replicación celular, y la biotina, que afecta la producción de lípidos (Mario Nieves et al. 2009). Una modificación de este medio, permitió una mayor optimización de los nutrientes dando lugar a F/2 de Guillard. (Mario Nieves et al. 2009) realizaron un estudio haciendo un barrido de las concentraciones del medio de Guillard, desde F/2 hasta 8F, en el crecimiento de la microalga *Chaetoceros muelleri*, concluyendo que las tasas de crecimiento diferían al aumentar la concentración de medio de cultivo, más los porcentajes de proteínas, carbohidratos y lípidos, si aumentaban con el aumento de los nutrientes en el medio de cultivo.

Otros medios de amplio espectro son el CHU, Medio basal de Bold (BBM), medio BG-11 entre otros, estos son medios enriquecidos tienen como fuente de nitrógeno el nitrato, el cual es fácilmente asimilado por las microalga, y difieren en el contenido de micronutrientes y vitaminas, por lo cual los rendimientos difieren entre especies. (A. Ilavarasi, D. Mubarakali, R. Praveenkumar 2011) realizaron un comparación entre los medios CHU 10, medio basal de Bold, medio basal de Bold acidificado, medio BG-11 y medio Hoagland modificado, sobre el crecimiento y el contenido total de clorofila de *Chlorella* sp. NTAI01, *Monoraphidium* sp. NTAI02 y *Scenedesmus* sp. NTAI03. Ellos concluyen que las microalgas *Chlorella* sp y *Monoraphidium* sp, se desarrollan más fácilmente en el medio CHU 10, mientras que el medio basal de Bold apoya el crecimiento de *Scenedesmus* sp. NTAI03, y atribuyen esta respuesta al equilibrio químico entre carbonato y silicato, el cual genera un tampón alcalino en el medio, y a la presencia de hierro, el cual es fundamental para la producción de clorofila.

Algunos medios de cultivo pueden ser específicos para un género de microalgas, como el medio Zarrouk que es específico para *Spirulina*, por su alto contenido de nitrógeno y carbonato. Y algunos son modificados para suplir necesidades puntuales, como en el caso del cultivo de diatomeas que requieren una cantidad mayor de silicio para obtener un buen crecimiento.

## 1.7.2 Medios de cultivo alternativo

### Aguas residuales

Debido a que las microalgas son organismos con una nutrición relativamente simple, basada en sales, las aguas residuales han sido evaluadas como medio de cultivo, ejerciendo a la vez un efecto biorremediador. Las aguas residuales pueden ser clasificadas en tres grupos: **(A)** domésticas, que se caracterizan por un alto contenido de materia orgánica proveniente de desechos humanos y animales, y/o procesos agrícolas, como lavados de galpones, cocheras o aguas de pescadería, las cuales son ricas en fuentes orgánicas de nitrógeno, como urea y amonio; **(B)** industriales, compuestas únicamente por aguas de salida provenientes de procesos específicos como calderas, curtimbres, y procesos de lavados de productos, ricas en sales como calcio, nitratos y fosfatos; y **(C)** mixtas que presentan desechos domésticos y una cantidad significativa de

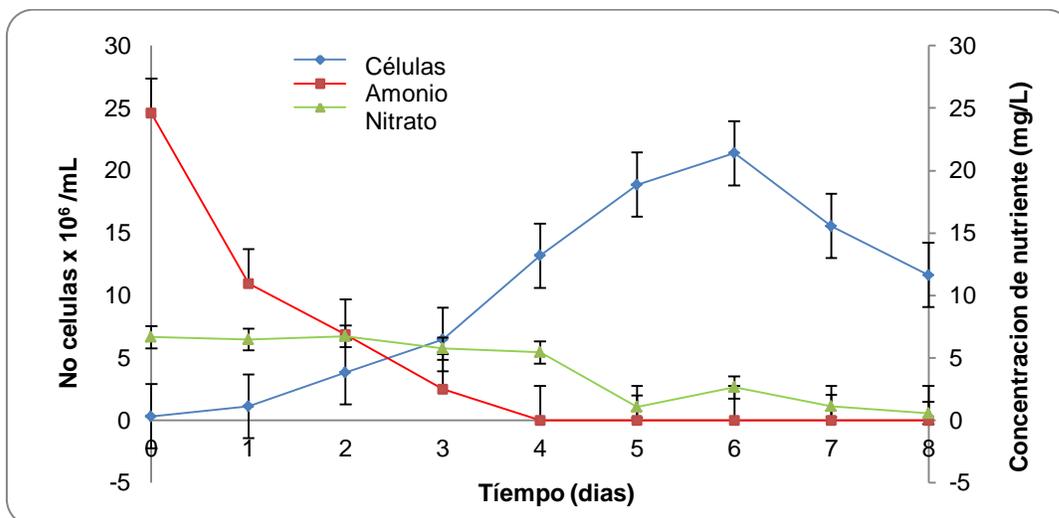
desechos industriales. Investigadores como Guayara y colaboradores (2014), han probado el cultivo de aguas residuales (AR) como medio de cultivo para la producción de biomasa microalgal de *Chlorella sorokiniana* y como medida para el tratamiento mismo de estas aguas gracias a la reducción de las sales disueltas en ellas (Guayara, Henao, and Acosta 2014).

Los estudios de producción de biomasa microalgal en medios de cultivo alternativos se han incrementado en los últimos años, ya que los costos actuales con medios comerciales, no son competitivos para el mercado. Las aguas residuales hacen parte de las soluciones planteadas para disminuir los costos, ejemplo de ello fue el trabajo de Moya y Yépez que realizaron un estudio de la utilización de subproductos mariculturales como medio de cultivo para microalgas, e indican que los beneficios son la reducción de costos, minimización del impacto de sustancias contaminantes para el ambiente como CO<sub>2</sub>, minimización de la eutrofización de cuerpos de agua, obtención de productos de interés comercial, aumento de la eficiencia del proceso, y generación de empleo (Merino Moya and Encomendero Yépez 2012).

Las aguas residuales provenientes de pescadería tienen en general niveles altos de nitrógeno, el cual puede ser asimilado por las microalgas para la generación de proteína, y así alimentar otra vez el sistema. Andrade y colaboradores (2009), evaluaron el crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp en aguas residuales derivadas de restos de pescadería, obteniendo concentraciones celulares similares a los obtenidos con el medio comercial, con un porcentaje de proteína de 24% en peso seco, y reportando eficiencias de remoción del 100% para nitrógeno, del 78% para fosfatos y del 36% para materia orgánica (Andrade et al. 2009).

Así mismo las aguas residuales provenientes de plantas de tratamientos se presentan como medios potenciales para el cultivo de microalgas. Un estudio realizado por Guayara y colaboradores (2014), evaluaron el crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en aguas residuales industriales, domésticas y mixtas, obteniendo producciones equiparables al medio comercial para las aguas domésticas y mixtas, pero no para las industriales que presentaban una concentración de nitrógeno pobre. También corroboraron que las microalgas asimilan primeramente el amonio y luego el nitrato (figura 4). El estudio concluye que es importante la concentración y forma de nitrógeno que posee un agua

residual para utilizarse como medio de cultivo alternativo para microalga (Guayara, Henao, and Acosta 2014)



**Figura 4.** Crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en un fotobiorreactor de 3 L; comportamiento del consumo de nitrato y amonio (Guayara, Henao, and Acosta 2014)

Una de las desventajas de utilizar aguas residuales para el cultivo de microalgas, son los riesgos sanitarios que genera la alta variabilidad y poco control sobre los contenidos de estas aguas, ya que puede tener patógenos, o residuos químicos que afectarían la calidad final de la biomasa, y reduciría los mercados a los que puede ser dirigida, como cosmético o alimenticio (Abdel-raouf, Al-Homaidan, and Ibraheem 2012)

### Fertilizantes agrícolas

La FAO define a un fertilizante como “Cualquier material natural o industrializado, que contenga al menos cinco por ciento de uno o más de los tres nutrientes primarios (N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O)”, y según el número de nutrientes primarios pueden ser simples cuando solo contiene uno, o multinutrientes cuando son más de 2. Además de la proporción nutricional los la calidad de un fertilizante está influenciada por su presentación física (granulometría), que tiene gran influencia en la solubilidad y biodisponibilidad de los nutrientes (FAO and IFA 2002). Dado el similar metabolismo que presentan las plantas y las microalgas los fertilizantes tienen la capacidad de suplir las sales necesarias para el crecimiento de microalgas.

Los fertilizantes presentan una buena fuente de nitrógeno, fosforo, potasio y micronutrientes, a un bajo costo y con retos sanitarios menores. Es así como Silva-Benavides (2016) obtuvieron buenos rendimientos en los cultivos de *C. sorokiniana* con fertilizantes agrícolas comerciales en condiciones de laboratorio (Silva-Benavides, 2016). Por otro lado, Valenzuela-Espinosa y colaboradores (2005), concluyeron que los fertilizantes agrícolas pueden ser usados en programas de acuicultura marina, al evaluar la producción de *Rhodomonas* sp, y su influencia como alimento para rotíferos, cuando estas son cultivadas en fertilizantes agrícolas y medio comercial para microalgas (Valenzuela-Espinoza, Lafarga-De la Cruz, Millán-Núñez, & Núñez-Cebrero, 2005), lo que es concordante con lo hallado por Torres y colaboradores (2012) quienes establecen que *Nannochloropsis oculata*, puede crecer en fertilizantes tanto agrícolas como acuícolas, y obtener una producción de biomasa igual y mayor a la obtenida con medios comerciales, sin sacrificar la calidad de la misma (Campaña-Torres, Martínez-Córdova, Martínez-Porchas, López-Elías, & Porchas-Cornejo, 2012).

## **1.8 Producción de biomasa microalgal en fotobiorreactores al aire libre**

Los cultivos de microalgas donde la temperatura y la luz no son controladas, sino suministradas por el ambiente son denominados cultivos al aire libre. El montaje de estos sistemas requiere conocer las dinámicas de los parámetros ambientales de la zona de montaje, y entender su efecto sobre el crecimiento de las microalgas, ya que la luz y la temperatura influyen de forma significativa en la eficiencia fotosintética.

### **1.8.1 Luz**

Este parámetro afecta el crecimiento microalgal en varios niveles, intensidad, longitud de onda y fotoperiodos de luz. En cultivos al aire libre adicional a los factores anteriores se evalúa la cantidad de luz en horas de luz solar por día, que para el caso de Urabá es alrededor de 7 horas (Ministerio de Minas y Energía and Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial Instituto de hidrología 2005)

- **Intensidad lumínica**

Hace referencia a la cantidad de flujo luminoso que recibe una superficie por unidad de área. Aunque cada microalga tiene una intensidad de luz específica, se ha establecido un

promedio de  $135.1 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , en el cual el flujo de luz no es tan bajo como para impedir que se dé la fotosíntesis, ni tan alta para inhibirla por exceso de flujo. Se ha registrado en *Chlorella vulgaris* un máximo de biomasa bajo intensidades de  $62.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , a diferencia de *Nannochloropsis salina* y *Tetraselmis suecica* ( $250$  y  $108.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  respectivamente). (Van Wagenen et al. 2012) (Khoeyi, Seyfabadi, and Ramezanpour 2012) (Go et al. 2012).

La intensidad es determinante en el diseño de fotobiorreactores, ya que debe asegurar que su superficie reciba un el flujo de luz adecuado, y también que la agitación permita que todo el cultivo pase de la superficie más iluminada al centro que recibe menos luz (Morales, Lodeiros, & Bermúdez, 2002) (Pradilla and Salcedo 2013).

- **Longitud de onda**

La longitud de onda a la cual crecen las microalgas está determinada por los pigmentos que ella posea. Diferentes longitudes de onda tienen incidencia en diferentes partes del metabolismo de las microalgas, algunas afectan directamente el crecimiento, mientras que otras aumentan la concentración de lípidos o favorecen la concentración de pigmentos, por ejemplo el crecimiento de *Chlorella* se ve favorecido a una longitud de onda de  $700 \text{ nm}$  (Pérez Pazos and Fernández Izquierdo 2012) (Casal Bejarano 2010). Cuando se trata de cultivos al aire libre se debe tener en cuenta que la calidad espectral aunque es amplia, varía con las condiciones climáticas, posición del sol a lo largo del día, los cambios estacionales y gases atmosféricos (Pradilla and Salcedo 2013). Una evaluación del crecimiento de *Nannochloropsis* sp, bajo diferentes longitudes de onda utilizando luces led, mostro que la microalga crece mejor con luz azul, seguido de blanca, verde y roja (Das et al. 2011).

- **Fotoperiodo**

El tiempo de exposición a la luz tiene incidencia en el metabolismo fotosintético de las células microalgales. En condiciones de laboratorio, bajo fuentes de luz artificiales, los cultivos generalmente se mantienen periodos de luz continua, lo que asegura una captación constante de energía y crecimiento de las células, omitiendo periodos de oscuridad que promueven la división celular. La sincronización de los cultivos (crecimiento – división celular) se logra entonces evaluando distintos periodos de luz -

oscuridad (8/16, 12/12, 16/8 o 24/0 horas luz/oscuridad) cuando se trata de una fuente artificial o el ciclo natural día y noche cuando el sol es la fuente de luz. (Khoeyi, Seyfabadi, and Ramezanpour 2012) (Pradilla and Salcedo 2013). Wahidin y colaboradores (2013) estudiaron el comportamiento de *Nannochloropsis* sp a diferentes intensidades de luz y fotoperiodos, y establecieron que la microalga presenta una fase exponencial más prolongada a una intensidad de  $100 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$  con la combinación de 18:06 ciclo luz: oscuridad. También observaron que a las mismas intensidades de luz, la producción de biomasa disminuía al aumentar el número de horas luz (Wahidin et al. 2013).

- **Fotoaclimatación**

La fotoaclimatación es una serie de procesos que se dan en una célula, como respuesta a cambios abruptos en la intensidad de luz recibida. La finalidad de estos procesos es la optimización de la luz y la mitigación de daños en los fotosistemas (González 2014). En condiciones de baja intensidad de luz, las microalgas tienen la capacidad de aumentar el tamaño de la antena receptora (mayor pigmentación), para aprovechar mejor la radicación. Por otro lado en condiciones de alta intensidad, una mayor productividad será lograda al disminuir la pigmentación, para evitar la sobresaturación de energía en los fotosistemas (Mooij et al. 2017).

## 1.8.2 Temperatura

La temperatura afecta la naturaleza del metabolismo, los requerimientos nutricionales y la composición de la biomasa, así como la solubilidad de los gases en el agua. Valores cercanos a los 30°C generalmente presentan las mayores tasas de crecimiento, como es el caso de *Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis salina* que han presentado un buen crecimiento a 28 y 26°C (Van Wagenen et al. 2012) (Velasco et al. 2006). La temperatura al igual que la luz es un factor de mucha variabilidad cuando las condiciones son las ambientales, en el caso de Urabá esta se encuentra alrededor de 28°C (Ortega-Salas and Reyes-Bustamante 2012).

## 1.9 Producción de microalgas al aire libre

A nivel mundial la mayoría de los cultivos al aire libre manejan una conformación de tipo piscina abierta en donde se han logrado obtener productividades de alrededor de 25

$\text{g/m}^2/\text{d}$ , sin embargo este tipo de sistemas de producción se desarrollan en ambientes desérticos, que aseguran en un constante flujo de luz sobre la superficie de los cultivos (tabla 3). Bajo esta conformación los estudios han concluido que el aumento de la luz aumenta la productividad en general (Lee 2013) (Bouterfas, Belkoura, and Dauta 2002).

En cuanto al efecto de la temperatura sobre cultivos al aire libre se ha encontrado que altera los equilibrios iónicos del agua, el pH, y la solubilidad de los gases (oxígeno y  $\text{CO}_2$ ), a la vez que se han presentado inhibiciones de crecimiento por presentarse condiciones que superan la temperatura de máxima productividad (Pulz 2001).

**Tabla 3.** Productividades alcanzadas en bajo sistemas de piscinas abiertas (Bouterfas, Belkoura, and Dauta 2002).

	Lugar	Especies	Productividad por área ( $\text{g/m}^2/\text{d}$ )	Área superficial ( $\text{m}^2$ )	Volumen total (L)
Producción comercial	Hawaii	<i>Tetraselmis suecica</i>	40		
	Hawaii	<i>Cyclotella cryptica</i>	29.7		
	Hawaii	<i>Platymonas sp.</i>	26	48	58
	Hawái	<i>Cyclotella cryptica</i>	30	9,2	1.1
	Hawái	<i>Tetraselmis suecica</i>	37.5	9,2	1.1
	New México	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	14	100	22.5
	New México	<i>Chlorella sp.</i>	21	100	22.5
	Israel	<i>Anabaena siamensis</i>	12.9	2	0.3
Tratamiento de aguas residuales	California	Cultivo mixto de microalgas	18.4	1000	
	Israel	<i>Micractinium sp.</i>	33	120	
	Israel	<i>Actinastrum sp.</i>	35	150	
	Nueva Zelandia	<i>Pediastrum sp.</i>	25	32	8
	Pilipinas	<i>Coelastrum sp.</i>	15.3	100	
	Escocia	<i>Chlorella sp.</i> <i>ankistrodesmus sp.</i>	18	13	
	España		12,7	1.54	
	Kuwait		15	12	

Por otra parte, los sistemas cerrados han obtenido productividades de alrededor de  $30 \text{ g/m}^2/\text{d}$ , ya que controlan las condiciones del cultivo, lo cual incrementa sus costos. En la

tabla 4 se pueden observar algunas de las productividades obtenidas bajo sistemas cerrados (Ruiz 2011).

**Tabla 4.** Productividades obtenidas bajo sistemas de fotobiorreactor(Ruiz 2011).

Especies	Tipo de reactor	Volumen (L)	Concentración $X_{max}$ (g/L)	Productividad (g/m <sup>2</sup> d)	Productividad (g/L.d)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Tubular	200	3	-----	1,5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Tubular	200	-----	20	1,2
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Tubular	200		32	1,9
<i>Chlorrella sorokiniana</i>	Tubular	6	1,5	-----	1,47
<i>Arthrospira platensis</i>	Tubular	11	6	47,7	2,7
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Tubular helicoidal	75	-----	13	1,4
<i>Haematococcus pluviales</i>	Tubular paralelo	25	-----	-----	0,05
<i>Haematococcus pluviales</i>	Cilindrico	55	1,4	-----	0,06
<i>Haematococcus pluviales</i>	Tubular	55	7	-----	0,41
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Placas planas	440	-----	-----	0,27
<i>Haematococcus pluviales</i>	Placas planas	25	-----	10,2	
<i>Spirulina platensis</i>	Tubular	5,5	-----	-----	0,42
<i>Arthrospira platensis</i>	Tubular	146	2,37	25,4	1,15
<i>Chlorrella sorokiniana</i>	Placas planas	400	-----	22,8	3,8
<i>Chlorrella sorokiniana</i>	Placas planas	400	-----	19,4	3,2
<i>Tetraselmis</i>	Cilíndrico	1000	1,7	38,2	0,42
<i>Chlorococcum</i>	Parábola	70	1,5	14,9	0,09
<i>Chlorococcum</i>	Cúpula	130	1,5	11	0,1

En Colombia se han hecho experimentaciones en la Guajira manejando sistemas raceways de piscinas al aire libre de 1200 L, con *Chlorella* sp, donde se han obtenido un máximo crecimiento en número de células de  $2,4 \times 10^5$  cel/mL lo cual es bajo comparado con productividades casi 10 veces mayores, obtenidas en el laboratorio (Gómez, Tirado, and Pérez 2013).

Estudios en sistemas cerrados al aire libre han sido reportados en condiciones desérticas ya que se busca aprovechar la constante luz solar suministrada por el ambiente. En Arequipa – Perú una zona desértica se evaluó la producción de *Spirulina*, en un fotobiorreactor tubular doblemente curvado bajo condiciones ambientales, obteniendo productividades de 1 g/m<sup>2</sup>/día (Huarachi Olivera et al. 2015).



Carepa se encuentra a 19 Km del mar y hace parte de la región conocida como golfo de Urabá (figura 5), donde las actividades económicas se basan en la producción de plátano principalmente y la pesca. La comunidad del golfo de Urabá se caracteriza por una gran heterogeneidad poblacional, producto de la confluencia e interacción de grupos étnicos y culturales, provenientes de distintos lugares con características sociales particulares: etnias indígenas (Emberá, Tule, Zenú), afrocolombianos (del Caribe, Atrato y Turbo), campesinos mestizos provenientes del Sinú y de Antioquia, de manera especial la comunidad de pescadores en su mayoría son desplazados por la violencia, que invadieron predios de fincas bananeras y encontraron en la pesca un sustento para sus familias, lo que ha resultado diversas formas de percepción, valoración y apropiación del entorno y de los recursos naturales (Gómez Aguirre and Turbay 2016)

La mayor colonización se presentó a mediados del siglo XIX estimulado por los auges extractivos de diferentes recursos (madera, caucho, tagua o raicilla de ipecacuana), esto se dio de forma desordenada y masiva, invadiendo predios bananeros, lo cual tuvo repercusiones en el desgaste de los mismos recursos, y la generación de comunidades con baja calidad de vida, sin puestos de salud, instituciones educativas o sitios de deporte, y bajos niveles de escolaridad (Cetmar et al. 2012).

La disminución del recurso pesquero es una problemática que se evidencia a nivel mundial, y se ve más agravada en zonas donde no se hacen buenas prácticas de extracción que permitan la sostenibilidad del recurso. Un estudio realizado con las principales comunidades pesqueras el golfo de Urabá, estableció la piscicultura como una alternativa socioeconómica, para lo cual es importante la producción de alimento vivo (Leal Flórez et al. 2017)

### **1.11 Costos de producción de biomasa microalgal**

La biomasa microalgal es materia prima para obtener productos que pueden dirigirse a biocombustibles, alimentación o farmacéuticos. Alfaro y colaboradores (2008) realizaron una valoración económica de la utilización de *Chlorella* sp como fuente proteica para piensos líquidos para la ceba de cerdos, en Cuba, y concluyeron que los costos de producción deben disminuir, para que sea factible emplear la biomasa mixta de microalgas como sustituto del 10 % de la fracción proteica del pienso que se emplea en la alimentación porcina, en las condiciones económicas cubanas actuales (Alfaro, Ugás,

and Miralles 2008). No obstante según Machado, una producción de biomasa en Colombia es viable, dadas las condiciones climáticas y la disponibilidad hídrica, y generaría ingresos netos por hectárea superiores a los obtenidos con palma de aceite. No obstante los costos de producción deben ser disminuidos (Machado 2014).

Dos ejes son determinantes en la reducción de los costos de producción para la industria microalgal; el medio de cultivo y la separación de la biomasa. Nieves (1994) detallaron el crecimiento de *Monoraphidium* sp en diferentes tipos de fertilizantes y expusieron las ventajas económicas de la utilización de estos medios alternativos con respecto al medio F de Guillard, estimando una reducción de más del 98% de los costos de medio de cultivo (Marío Nieves et al. 1994).

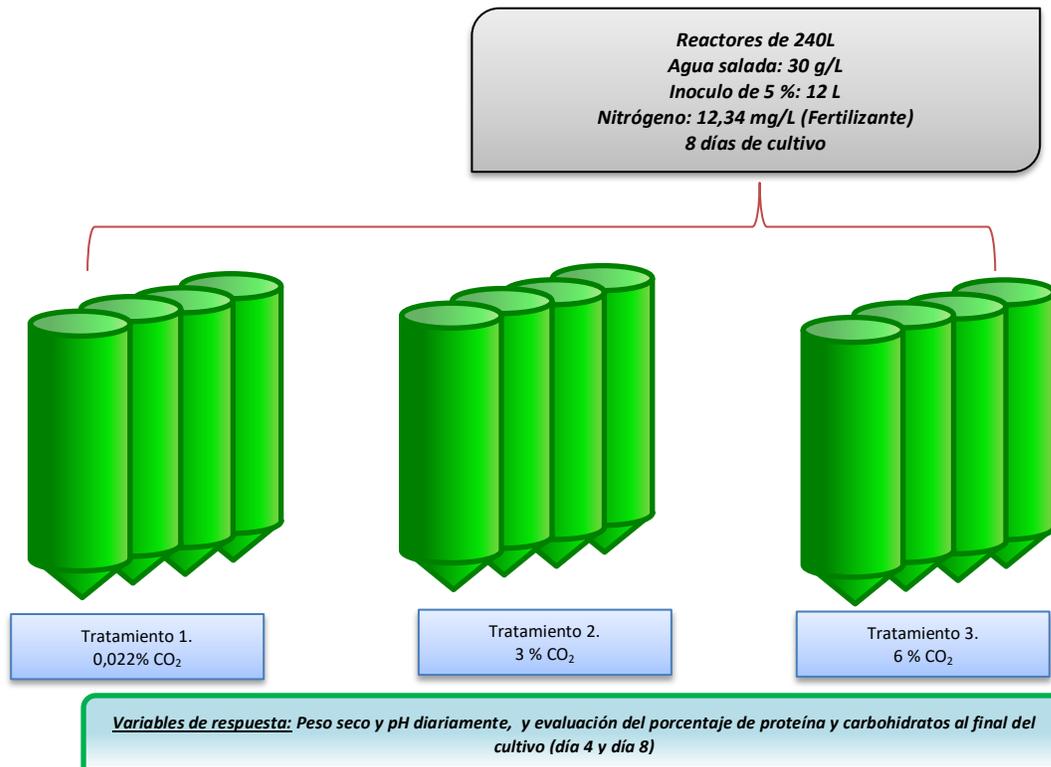
## 2. Metodología

### 2.1 Efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en la producción de biomasa

Las cepa *Nannochloropsis* sp fue proporcionada la unidad del acuario de la Corporación Parque Explora. La microalga fue crecida en frascos de Erlenmeyer de 500 mL, en medio comercial F/2 de Guillard, con agitación neumática de 0,3125 vvm y luz artificial de 135  $\mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$ .

Se hicieron cultivos batch con 3 mezclas aire-CO<sub>2</sub> con un tiempo de cultivo de 8 días, teniendo como medio de cultivo el fertilizante agrícola con una concentración de 12,36 mg de nitrógeno total/Litro, que es la concentración de nitrógeno presente en el medio comercial F/2 de Guillard; Los FBR tienen un fondo cónico y una relación altura diámetro de 135 cm / 45 cm, elaborados en fibra de vidrio con una transparencia del 95%, con un volumen de trabajo de 240 litros de agua salada (30g de sal/L), con agitación neumática con 0,3125 vvm y un inoculo del 5% v/v de la microalga *Nannochloropsis* sp. Para determinar la concentración de fertilizante se emplearon los fotobiorreactores del laboratorio de microalgas de la unidad del acuario de la corporación Parque Explora, manteniendo la temperatura a 23°C y un intensidad de luz de 135  $\mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$ .

Para evaluar el efecto de las mezclas aire-CO<sub>2</sub> en la corriente de aire, se desarrolló un diseño experimental unifactorial con tres niveles. Cada nivel se cuantifico y ajusto con la ayuda de analizador de gas para CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> BlueSens gas sensor GmbH proporcionado por el Grupo de Biotransformación. El primer nivel de CO<sub>2</sub> fue sin emplear adición de CO<sub>2</sub> en el flujo de alimentación (el CO<sub>2</sub> presente en el aire fue de 0,022%). Los niveles 2 y 3 fueron realizados mediante pulsaciones de CO<sub>2</sub> mediante el uso de un regulador de presión y una electro válvula (10 segundos prendido/ 30 segundos apagado) y aumentando la presión se ajustó a 3 y 6 % de CO<sub>2</sub> en la corriente gaseosa. Para cada nivel se hicieron 4 réplicas. Se cuantificó la biomasa por peso seco y se realizó el seguimiento del pH diariamente, al igual que el porcentaje de proteína y carbohidratos en la biomasa cosechada al final del cultivo.



**Figura. 6** Diagrama del diseño estadístico unifactorial para evaluar el efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> sobre la producción de biomasa microalgal

## 2.2 Cuantificación de las variables de respuesta

### 2.2.1 Concentración de biomasa, proteína y carbohidratos

La biomasa fue cuantificada por peso seco como lo reportó (García 2009). El porcentaje de proteínas se realizó por el método de Lowry (Lowry et al. 1951) según la adaptación que realizó (Essmann 2011) para la biomasa microalgal (Anexo A). La cuantificación de carbohidratos se realizó por el método de Dubois (Dubois et al. 1956), con las modificaciones hechas por (Romero 2010) para biomasa microalgal (Anexo B).

## 2.2.2 Determinación de la intensidad lumínica en los cultivos al aire libre

La intensidad lumínica fue medida con un luxómetro digital Lutron LX-105. Para la determinación de la intensidad lumínica en el montaje al aire libre en Carepa, se tomaron 9 puntos de muestreo, 8 distribuidos en la superficie de 2 reactores ubicados en los extremos del área de cultivo, y 1 tomado en perpendicular como se ven en la figura 8.

### Calculo de la intensidad disponible

La determinación de la intensidad de luz disponible para las células dentro del cultivo del reactor se realizó utilizando siguiente fórmula:

$$I_{av} = \frac{I_0}{K_a \cdot X \cdot L_{eq}} (1 - \exp(-K_a \cdot X \cdot L_{eq})) \quad (\text{Huesemann et al. 2016})$$

Dónde

$I_{av}$ : Intensidad media al interior del reactor

$I_0$ : Intensidad recibida en la pared del reactor.

$K_a$ : Coeficiente de extinción de la microalga

$X$ : Concentración de la biomasa

$L_{eq}$ : Parámetro del diseño del reactor o longitud equivalente

La constante de extinción  $K_a$  fue calculada de forma experimental para la cepa microalgal utilizada, con la fórmula  $A(\lambda) = K_a(\lambda) \cdot X \cdot L$  (anexo C). La intensidad media recibida en la pared del reactor ( $I_0$ ) se calculó con la fórmula (anexo D).

$$I_0 = [Sl(i_1 + i_2 + i_3 + i_4) + Ss(i_5)]/St$$

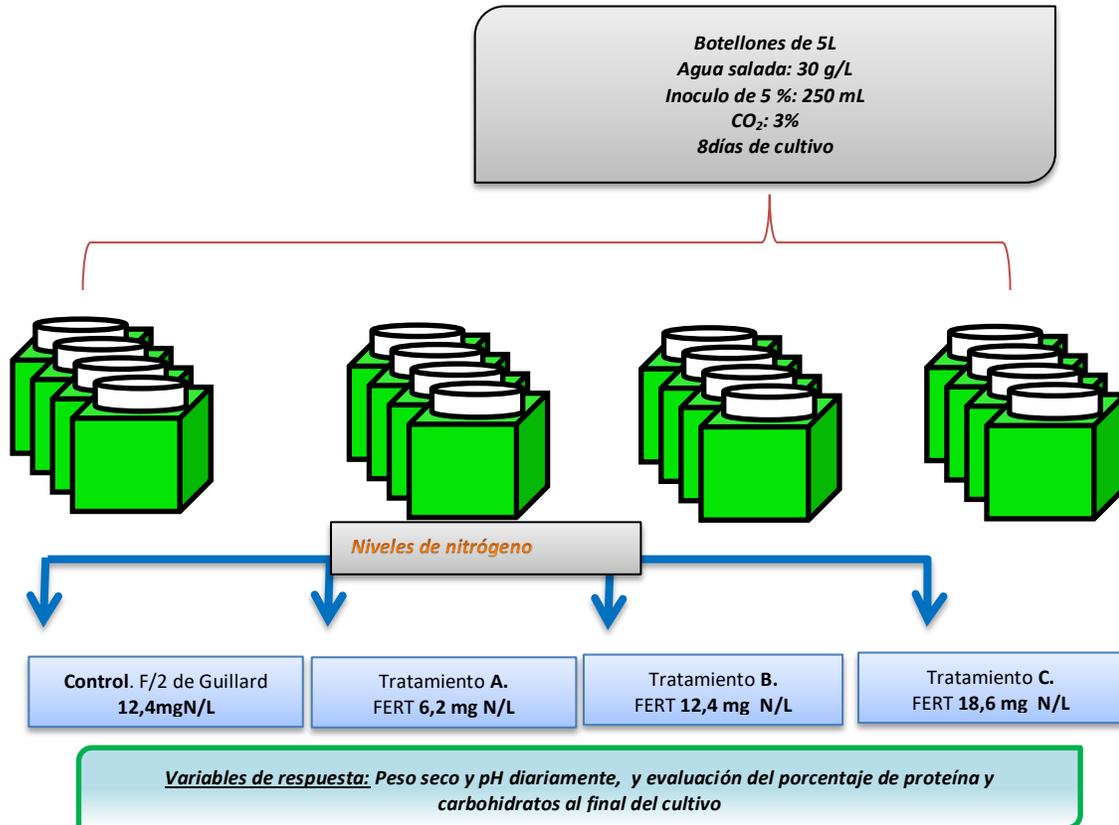
$L_{eq}$  es una función del radio ( $r$ ) para el caso de los biorreactores tubulares, este parámetro varía entre  $1,57r$  y  $1,71r$  (Acién Fernández et al. 1997)

## 2.3 Evaluación de un fertilizante agrícola como medio de cultivo

El fertilizante utilizado para la experimentación fue FER MASTER 13-40-13 de la casa comercial Valagro. La presentación es en forma de cristales con la siguiente composición: nitrógeno total 13,6% (nitrógeno amoniacal 9,15%; nitrógeno nítrico 4.45%); fósforo 39.66%; potasio 13,75%; azufre (SO<sub>3</sub>) 5.5%; boro 0,024%; cobre 0,038%; hierro 0.0038%; manganeso 0,0073%; zinc 0,0004%; agente quelante: EDTA, que le confiere un alto porcentaje de solubilización. El medio control utilizado fue F/2 de Guillard con los siguientes componentes nitrato de sodio 63%, fosfato de disódio 4,25%, silicato de sodio 25,48%; sulfato cúprico 0,01%; sulfato de zinc 0,02%; cloruro de cobalto 0,01%; cloruro de magnesio 0,146%; molibdato de sodio 0,01%; cloruro de hierro 2.56%; EDTA disodio 3,7%. (Guillard and Ryther 1963)

Con el propósito de determinar la concentración de fertilizante adecuada para maximizar la producción de biomasa, se realizó un diseño estadístico unifactorial con tres niveles de fertilizante. Para ello, se evaluaron 3 concentraciones del fertilizante de acuerdo al aporte final de nitrógeno total al medio de cultivo, empleando como punto medio la concentración de nitrógeno del medio de referencia F/2 de Guillard (12,4 mg de Nitrógeno total/L), siendo estas 6,23; 12,36; 18,72 mg Nitrógeno total/L (Tratamiento a, b y c respectivamente).

Se hicieron 4 réplicas para cada tratamiento. La experimentación se desarrolló en las instalaciones laboratorio de microalgas de la unidad del acuario de la corporación Parque explora en reactores de 5 Litros de volumen de trabajo en agua salada (30 g/L) con agitación neumática (0,3125 vvm). El inóculo fue del 5 %v/v, los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 23°C y una intensidad de luz de 135  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . De acuerdo a los resultados de la concentración de CO<sub>2</sub> se fija la mejor condición para realizar la evaluación de la concentración de fertilizante. Para el seguimiento de los cultivos, se cuantificó diariamente el pH y la biomasa por peso seco, y el porcentaje de proteína y carbohidratos en la biomasa cosechada al final del cultivo.



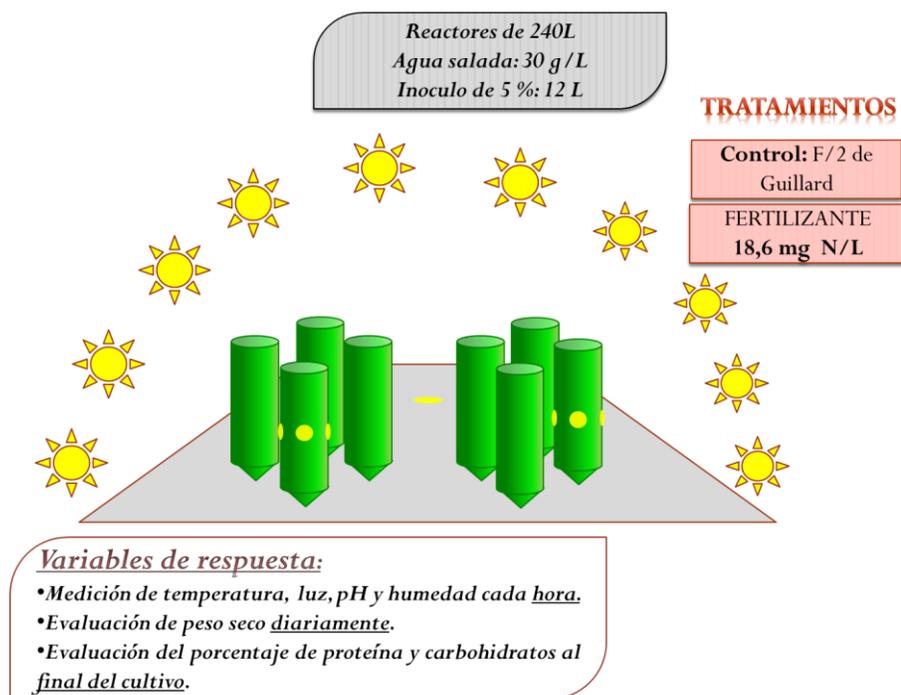
**Figura. 7** Diagrama del diseño estadístico unifactorial para evaluar diferentes concentraciones de fertilizante teniendo como medio control F/2 de Guillard.

## 2.4 Cultivos de biomasa de *Nannochloopsis* sp al aire libre

Los cultivos al aire libre se realizaron en fotobiorreactores de 250 Litros en la sede Tulenapa de la Universidad de Antioquia ubicada en Carepa-Antioquia (Los diseños de los FBR presentan la misma similitud geométrica y volumen del acuario del Parque Explora). Se evaluó el crecimiento de la microalga en 3 fotobiorreactores con el medio comercial F/2 de Guillard y en 5 fotobiorreactores con el fertilizante con una concentración final de nitrógeno determinada de acuerdo a los mejores resultados de la evaluación del fertilizante y del CO<sub>2</sub>, siendo este último suplementado en el aire por pulsos entre las 6 y las 18 horas del día. Para asegurar las mismas condiciones de CO<sub>2</sub> se utilizaron los mismos equipos de regulación de aire (electroválvula y reguladores de presión). Adicionalmente se realizó un cálculo de la cantidad de aire generada por el compresor en Uraba y se regulo la presión de salida y flujo tanto del compresor como del

CO<sub>2</sub> de la pipeta, alcanzando la concentración de 3% V/V una vez la válvula de presión fuera encendida.

Si bien, para este caso no se realizó ningún diseño experimental lo que se quiso realizar fue la validación de las condiciones obtenidas en el laboratorio comparadas con los cultivos bajo condiciones ambientales y al aire libre tanto en medio con fertilizante como con el medio de control. Para determinar la intensidad lumínica se realizaron mediciones de la intensidad de luz en 9 puntos en el área de los reactores entre las 6 y las 19 horas del día, como se ve en la figura 8. Las mediciones de temperatura en los FBR se realizaron, en la pared exterior y en el interior del fotobiorreactor, y se hizo un seguimiento de pH y humedad relativa alrededor de los FBR.



**Figura 8.** Diagrama del diseño de cultivo al aire libre empleando medio control F/2 de Guillard y fertilizante agrícola a 18,6 mg de N/L, evaluados en las condiciones ambientales de Carepa-Antioquia en la producción de biomasa microalgal. Puntos de muestreo de intensidad de luz.



**Figura 9.** Fotobiorreactores al aire libre en columnas de burbujeo de 250L y botellones de 20 L de la microalga *Nannochloropsis* sp en la Sede de Tulenapa Carepa-Antioquia.

## 2.5 Evaluación de los costos de medio de cultivo

El cálculo de los costos del medio de cultivo por un kilogramo de biomasa se basó únicamente en el valor comercial del medio de cultivo y la cantidad de acuerdo a la concentración de la fuente de nitrógeno requerida y la cantidad de biomasa microalgal producida. Se realizó el cálculo para preparar 1 litro de cada medio de cultivo, y luego se calculó con la concentración máxima alcanzada de la microalga al aire libre, el número de litros necesarios para obtener un kilogramo de biomasa, para luego obtener los costos de producir 1 kg de biomasa según el medio de cultivo empleado.

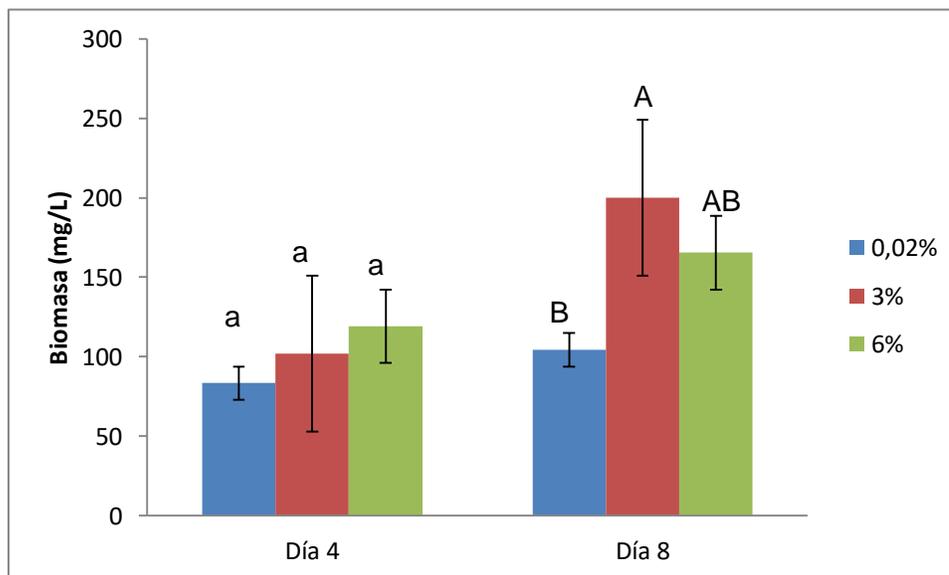
## 2.6 Análisis estadísticos

Los valores medios y las desviaciones estándar se calcularon a partir de los datos obtenidos experimentalmente realizados de manera independiente (biomasa, tasa de crecimiento, proteína y carbohidratos). El análisis de la varianza se realizó mediante ANOVA y pruebas de Tukey utilizando el paquete estadístico R-estudio. Las diferencias estadísticas se basaron en los valores-p (vp), cuando  $vp < 0,05$  comparados entre los tratamientos estos representarían una diferencia estadísticamente significativa.

### 3. Resultados y discusión

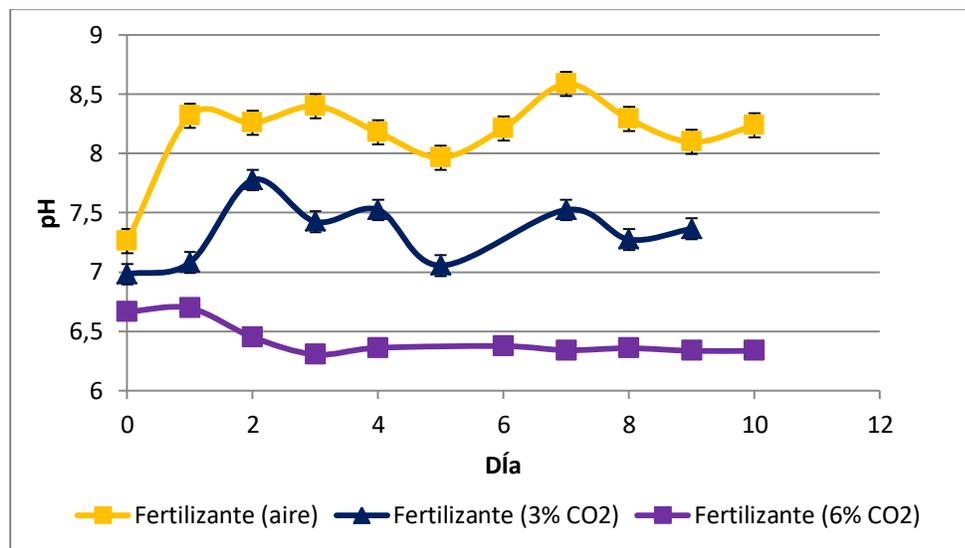
#### 3.1 Evaluación de la concentración de CO<sub>2</sub>

En la evaluación de la concentración de CO<sub>2</sub>, *Nannochloropsis* sp no mostro diferencias significativas ( $vp > 0,05$ ) entre los tratamientos del día 4, así mismo se observó un crecimiento similar al día 8, en los tratamientos donde el aire fue suplementado con CO<sub>2</sub> (3% y 6%), sin embargo, si hubo una diferencia estadísticamente significativa con respecto al montaje con solo aire ( $vp = 0,030$ ), siendo este último tratamiento el de menor concentración final de biomasa (Figura 10). Este comportamiento es propio de los organismos con fotosíntesis C3, en donde la enzima de captación del CO<sub>2</sub> es la enzima RUBISCO y se caracteriza por tener una actividad lenta y poseer también afinidad por el oxígeno, generando en condiciones de baja concentración de CO<sub>2</sub> (0,022%) que ocurra la fotorespiración, proceso de alto gasto energético y ninguna ganancia metabólica (García 2009).



**Figura 10.** Concentración de biomasa de *Nannochloropsis* sp producida al día 4 y 8, en diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> en la corriente gaseosa (0,02; 3 y 6%). Las letras diferentes muestran una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

Varios autores han encontrado resultados similares, tal es el caso de un estudio realizado con *Scenedesmus*, muestra que el crecimiento se ve limitado a concentraciones inferiores a 3,8 % de CO<sub>2</sub> en la corriente gaseosa (Cabello, Morales, and Revah 2017). Por otro lado, Verma y colaboradores (2018) evaluaron varias concentraciones de CO<sub>2</sub> entre 1,3 y 7 % (v/v), concluyendo que la concentración óptima de CO<sub>2</sub> que promueve la mayor tasa de secuestro por *Nannochloropsis* sp. y *Arthrospira platensis* fue respectivamente de 3,42% y 2,97% (v/v), evidenciaron un aumento del 100% en la tasa de secuestro de CO<sub>2</sub> específico cuando el aporte de CO<sub>2</sub> se incrementó del 1,36% (v/v) al 3,42% (v/v) en el caso de *Nannochloropsis* sp (Verma et al. 2018), sin embargo concentraciones mayores mantenían o disminuían la tasa de secuestro, lo que es concordante con los resultados obtenidos, ya que no se evidencio diferencia significativa en la obtención de biomasa con concentraciones de 3% y 6% de CO<sub>2</sub> (Tabla 5). Por otro lado, Cheng y colaboradores (2006) indica que en fotobiorreactores tubulares para *Chlorella vulgaris* la mayor fijación se obtiene a 1% de CO<sub>2</sub> de concentración y concentraciones superiores son menos eficientes fotosintéticamente (Cheng et al. 2006).



**Figura. 11** Seguimiento de pH de los cultivos de *Nannochloropsis* sp crecidos en diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>.

Otro factor de influencia que tiene el CO<sub>2</sub> está relacionado con su disociación en el agua en donde se produce ácido carbónico, que genera una baja de pH, llegando a niveles que pueden inhibir la acción de las proteínas involucradas en fotofijación e inhibir el crecimiento microalgal. Bartley y colaboradores (2013) muestra que a pH de 6 si hay una marcada disminución en el crecimiento de la microalga *Nannochloropsis salina*, y estima que por debajo de 7 ya hay una inhibición, no obstante en el estudio se utilizan buffer para ajustar el pH y no la concentración de CO<sub>2</sub>, el cual al ser un nutriente de la microalga puede no ejercer un efecto inhibitorio tan marcado (Bartley et al. 2013). Los resultados muestran que el pH se mantuvo por debajo de 6,5 (pH promedio de 6,4) para la concentración de 6% de CO<sub>2</sub>, lo cual pudo tener un aparente efecto inhibitorio.

**Tabla 5.** Tasas de crecimiento, porcentaje de proteína y carbohidratos de la biomasa obtenida en diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>

Concentración de CO <sub>2</sub>	$\mu$ (d-1)	vp ( $\mu$ )*	% de Proteína	vp (% de Proteína)*	% de Carbohidratos	vp (% de Carbohidratos)*
0,022%	0,153(a)	0,353	11%(ab)	0,005	10%(a)	0,066
3%	0,212(a)		13%(a)		12%(a)	
6%	0,237(a)		9%(b)		13%(a)	

\*Los valores vp < 0,05 representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos

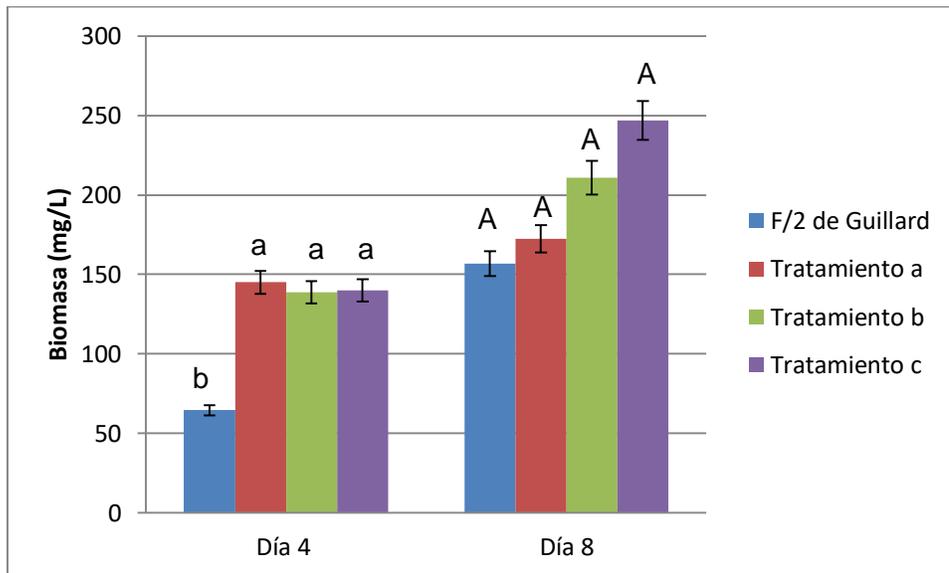
Los resultados obtenidos al final de los cultivos presentan que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de crecimiento, ni en el porcentaje de carbohidratos, sin embargo la proteína si mostró diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de CO<sub>2</sub> 3% y 6%, siendo el primero el de mayor porcentaje de proteína, mostrando así, una relación inversa al incremento de la concentración de CO<sub>2</sub>, lo cual puede indicar que una relación Carbono/Nitrógeno bajo puede aumentar la síntesis de aminoácidos como lo reporta Verma y colaboradores (2018), donde el nitrato adicional metabolizado por microalgas para producir aminoácidos habría aumentado la acumulación de biomasa a 3,9 g/L en el caso del cultivo discontinuo de *A. platensis* (Verma et al. 2018).

Debido a que al aumentar de 3 a 6% la concentración de CO<sub>2</sub>, no hay una retribución en aumento de concentración de biomasa o en porcentaje de proteína, para las

posteriores experimentaciones se tomara la concentración de 3% como una condición establecida.

### 3.2 Evaluación de la concentración de Fertilizante

De las 3 concentraciones de fertilizantes evaluadas (tratamiento a, b y c, que corresponden a 6,23; 12,36; 18,72 mg N/L respectivamente) la mayor biomasa fue obtenida en el tratamiento c con de 289 mg/L, seguido por el tratamiento a y b. En todos los casos, los resultados obtenidos fueron mayores a los obtenidos con el medio de cultivo de referencia F/2 de Guillard. Por otro lado, no se observó una inhibición en el crecimiento de la microalga y aparentemente, se puede esperar mayores producciones de biomasa si se aumenta la cantidad de fertilizante basados en los resultados de los niveles evaluados en este experimento. Estos resultados muestran que la microalga es capaz de tolerar una concentración de nitrógeno mayor a la suministrada por F/2 de Guillard, y ratifica al nitrógeno como el macronutriente de mayor influencia después del carbono.



**Figura. 12** Crecimiento de *Nannochloropsis* sp en diferentes concentraciones del fertilizante agrícola (a: 6,23; b: 12,36; c: 18,72 mg de Nitrógeno/L) y F/2 de Guillard como medio de referencia (12,36 mg de Nitrógeno/L) en el día 4 y 8.

Los resultados muestran diferencias significativas en la concentración de biomasa microalgal obtenida al día 4 en los distintos tratamientos, atribuyendo esta diferencia al medio de referencia F/2 de Guillard con la menor producción. Por otra parte al día 8, se

observó en la concentración de biomasa una tendencia proporcional con el aumento de la concentración de nitrógeno inicial en el medio de cultivo (Figura. 12), sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas, y puede ser explicado por factores externos como falta de CO<sub>2</sub>, luz o temperatura óptima que pueden impedir que el nitrógeno en la célula sea dirigido a replicación celular, y sea transformado a proteínas (referencia para esta hipótesis).

En la tabla 6 se muestran los resultados porcentaje de proteínas obtenido en los diferentes tratamientos, siendo el tratamiento de mayor concentración de nitrógeno (Tratamiento c, 18,6mg N/L) el de mayor porcentaje, seguido por el medio de referencia, tratamiento b y tratamiento a, quien fue estadísticamente diferente. Las tasas de crecimiento al igual del porcentaje de carbohidratos no presentaron diferencias entre los tratamientos. Dado lo anterior, y pese a que no hay diferencias significativas entre los 3 tratamientos de nitrógeno, se tomó como punto decisivo la concentración proteica de la biomasa, ya que como objetivo el estudio busca obtener un alimento animal, y adicionalmente la interacción de la luz ambiental, ha mostrado mejorar los rendimientos en crecimiento y en concentración proteica, así que proporcionar para la microalga la mayor concentración de nitrógeno, para que no se limitara su crecimiento, si su taza aumenta en el cultivo al aire libre.

El estudio realizados por López y colaboradores (2015) en el crecimiento de *Chaetoceros muelleri* con diferentes fuentes y concentraciones de nitrógeno (F/2, 2F y 4F de Guillard) mostraron un comportamiento similar a lo hallado experimentalmente, donde el aumento de la concentración de nitrógeno no genera un impacto significativo en la producción de biomasa y proteínas, no obstante en el estudio los intervalos de nitrógeno son más amplios y las concentraciones más altas, que los evaluados y pueden suponer una inhibición por sustrato (López et al. 2015). Sin embargo las limitaciones de nitrógeno en el tratamiento a, generaron una disminución del 38 % de la proteína, similar a lo hallado por Olofsson y colaboradores (2014), donde el porcentaje de proteínas disminuyo en un 20% para *Nannochloropsis oculata* cuando se cultivó en medios de cultivo con limitación de nitrógeno(Olofsson et al. 2014).

**Tabla 6.** Tasa de crecimiento, porcentaje de proteína y carbohidratos de la biomasa obtenida en diferentes concentraciones de fertilizante (Tratamientos a, b y c) y en el medio control de referencia F/2 de Guillard.

Concentración de CO <sub>2</sub>	$\mu$ (d-1)	vp ( $\mu$ )*	% de Proteína	vp (% de Proteína)*	% de Carbohidratos	vp (% de Carbohidratos)*
Tratamiento a	0,493(a)	0,1327	11%(a)	0,0005029	9%(a)	0,3353
Tratamiento b	0,413(a)		18%(b)		9%(a)	
Tratamiento c	0,521(a)		21%(b)		9%(a)	
Control	0,434(a)		20%(b)		10%(a)	

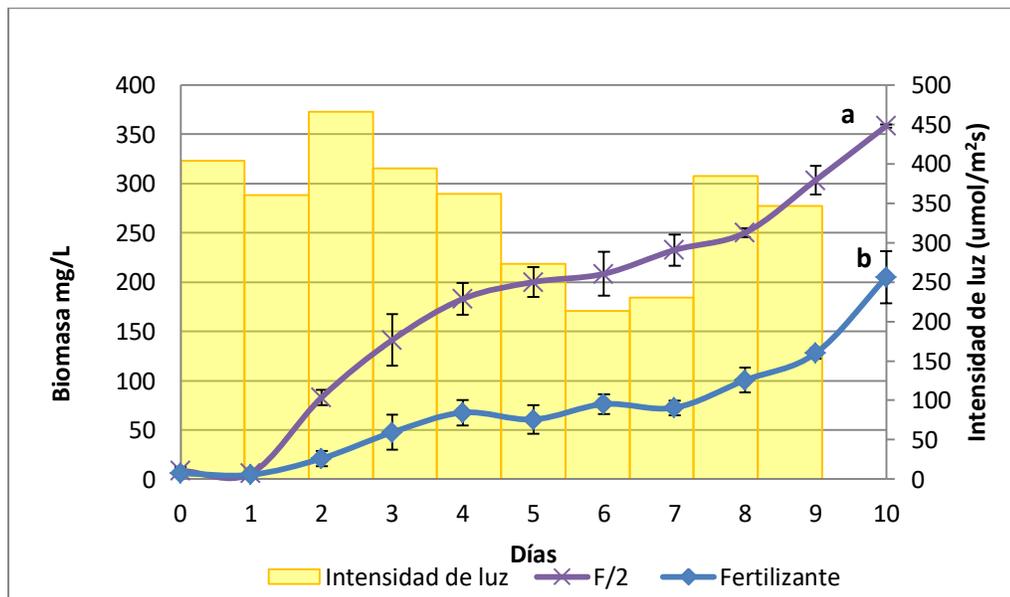
\*Los valores vp < 0,05 representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos

El pH en todos los tratamientos se mantuvo en un rango de 6,4 -6,8, lo cual indica que esta variable no fue influenciada por la cantidad de fertilizante, sino por la concentración de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo. La ligera acidez registrada en los cultivos pudo estar relacionada con el cambio de escala del sistema, ya que el volumen de trabajo fue de 5,5 litros y los difusores presentaron una burbuja más pequeña lo cual proporciona una mejor solubilidad de CO<sub>2</sub> en el agua y disminuye el pH. De forma similar se presenta el trabajo reportado por Ortiz-Moreno y colaboradores (2010) que estudio el crecimiento de *Chlorella Sorokiniana* en gallinaza como medio de cultivo a pH de 6,7 han mostrado que, no hay una influencia en el crecimiento de la microalga en pH ligeramente ácidos (Ortiz-Moreno et al. 2010).

### 3.3 Producción de biomasa en Fotobiorreactores al aire libre

#### Obtención de biomasa y perfiles de pH

La concentración de biomasa presentó diferencias significativas entre los tratamientos (medio con Fertilizante y medio F/2 de Guillard) siendo mayor la obtenida en el medio referencia F/2 con 360 mg/L, llegando casi al doble de la obtenida en el fertilizante agrícola. En ambos tratamientos el crecimiento fue menor entre los días 5 a 7, los cuales concuerdan con los días de mayor nubosidad y una intensidad lumínica externa (I<sub>0</sub>) por debajo de 300  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$  (figura. 13), sin embargo la intensidad promedio no fue menor a 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$  durante la experimentación. El pH de los cultivos en el día estuvo entre 7 y 8, y en la noche estuvo entre 8 y 9.

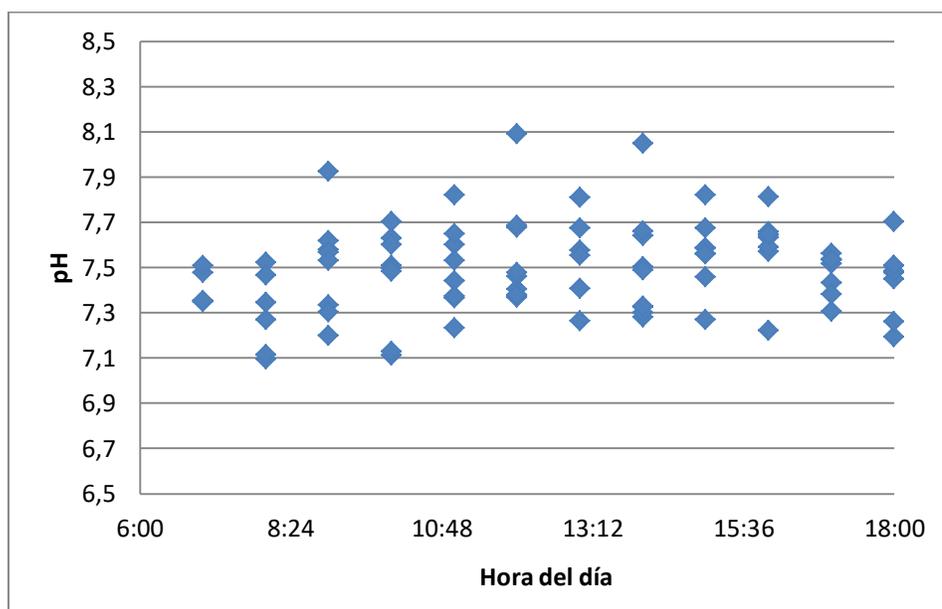


**Figura. 13** Crecimiento de *Nannochloropsis* sp en fotobiorreactores de 240 Litros, en fertilizante y medio de referencia F/2 de Guillard e intensidad de luz promedio por día

Velasco y colaboradores en 2006 reportaron producciones de biomasa un poco más altas a comparación de las obtenidas (entre 350 a 750 mg de biomasa/L) para *Nannochloropsis* sp cultivada a diferentes intensidades de luz e inyecciones de CO<sub>2</sub> (Velasco et al. 2006); así mismo Valdés y colaboradores en 2012 registraron

concentraciones finales de biomasa para *Nannochloropsis oculata* cultivada al aire libre en fotobiorreactores tipo columna de burbujeo, de 360 mg/L, similares a las obtenidas experimentalmente (Valdés et al. 2012).

El control de la inyección de CO<sub>2</sub> en el estudio de Valdés y colaboradores, era automático y estaba correlacionado al cambio de pH en el medio de cultivo. Ellos observaron que cerca del medio día la microalga modificaba el pH con más rapidez por lo cual consumía más CO<sub>2</sub>, y concluyen que la mayor actividad fotosintética se lleva a cabo durante este espacio de tiempo. En nuestro estudio las dinámicas de pH observadas en diferentes horas del día (figura 14), muestran un comportamiento similar, con un pico alrededor del medio día donde la intensidad luminica es mayor (figura 15), y puede indicar que la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto en el medio decrece, producto de una mayor intensidad luminica, y genera una disminución del ácido carbónico y por ende aumento del pH (Valdés et al. 2012).



**Figura. 14** Dinámicas de pH del cultivo de *Nannochloropsis* sp, en los fotobiorreactores al aire libre en diferentes horas del día.

### Intensidad de luz

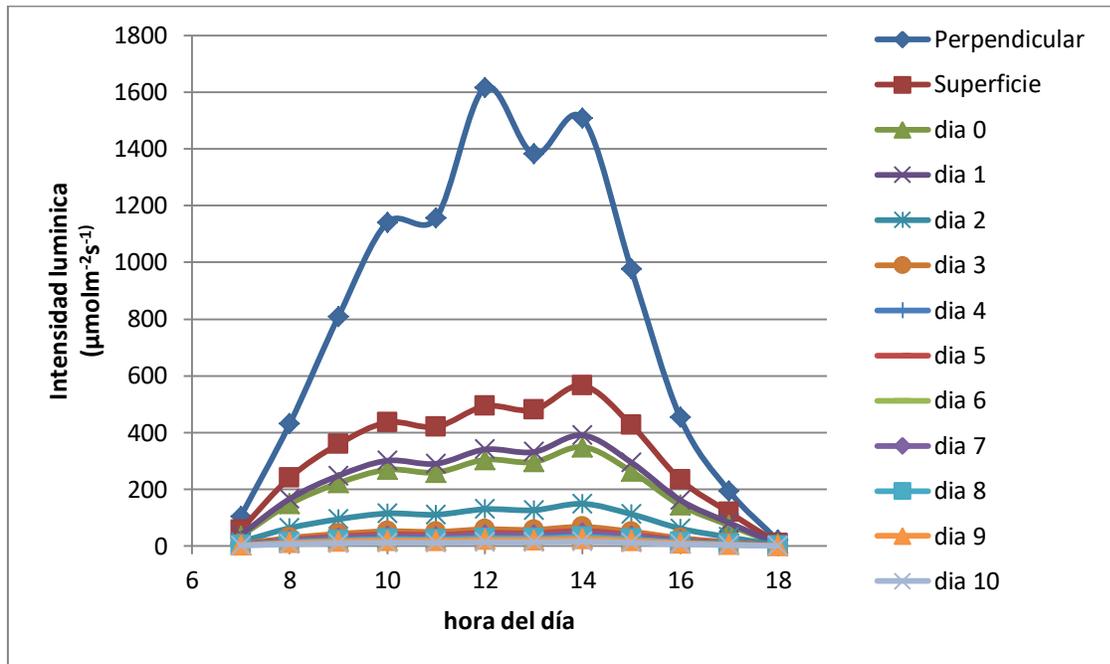
Al trabajar con volúmenes bajos, los cultivos pueden tener una mejor homogenización, aumentando el contacto de las células con la luz, y finalmente permitiendo una mayor

actividad fotosintética. Lo anterior explica la disminución de la biomasa que se da cuando los cultivos pasan a volúmenes mayores donde la relación superficie/volumen es menor. En estos casos la biomasa al incrementarse, puede impedir la penetración de la luz hacia el interior del reactor. Javannardian y Palsson (1991) proponen, para que la eficiencia en la penetración de la luz sea alta se requiere de una relación superficie volumen entre 5 y 10  $\text{cm}^2/\text{cm}^3$ , en el caso del reactor utilizado esta relación es de 0,1  $\text{cm}^2/\text{cm}^3$  por lo cual es más probable que en los últimos días se genera una foto-limitación (Javanmardian and Palsson 1991).

Los cultivos al aire libre la luz no es uniforme en los FBR y la intensidad lumínica puede causar fenómenos de fotoinhibición cuando es muy alta o fotolimitación cuando es muy baja, por lo cual es importante establecer cuál es la cantidad de luz que está recibiendo el cultivo al interior del reactor. De acuerdo con los resultados, aunque la intensidad lumínica perpendicular ( $I_5$ ) es alta llegando en promedio a 1600  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  (Figura 15), la intensidad recibida en la pared del reactor ( $I_0$ ) se encuentra alrededor de 500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  la cual según la literatura es óptima para el crecimiento de *Nannochloropsis*. (García 2009)

Blanken y colaboradores (2016), establecen que al aumentar la concentración de biomasa en el medio de cultivo la intensidad disponible para fotosíntesis al interior del sistema baja, tendiendo a ser cero en cultivos tipo columna de burbujeo, donde la relación área superficial/volumen es baja (Blanken et al. 2016).

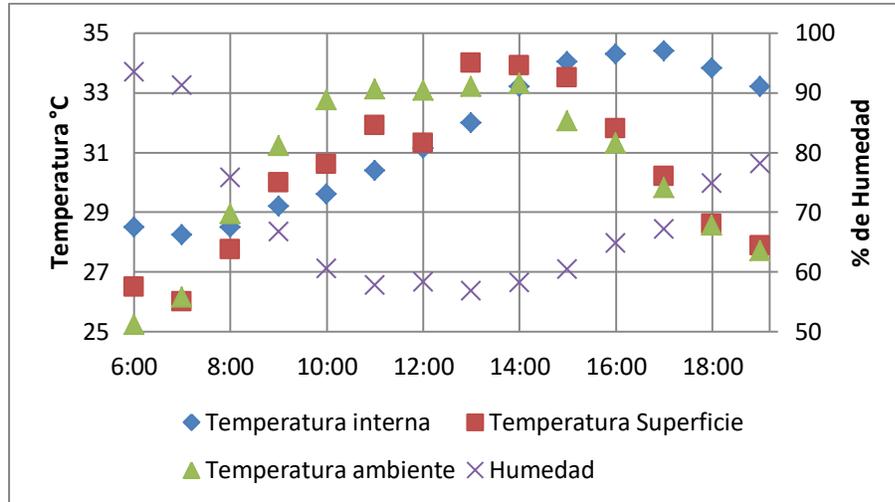
Gonzalez (2014), estudio el comportamiento de *Nannochloropsis* en diferentes intensidades ( $I_0$ ) y establece que entre 91 y 282  $\mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$  no ejercen una diferencia significativa en la productividad de biomasa, e indican que la eficiencia fotosintética es mejor a intensidades más bajas (González 2014). En el caso de los cultivos en la SEEA en Carepa-Antioquia, la intensidad disponible promedio ( $I_0$ ) para las microalgas se encontró entre 296  $\mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$  en el día 1, hasta 15  $\mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$  en el día 10 (Figura 15). Si bien son intensidades bajas, Investigadores como Khoeyi y colaboradores (2012), concluyeron para el caso de *Chlorella vulgaris*, una intensidad óptima de 62,5  $\mu\text{molm}^2\text{s}^{-1}$ , por lo que podemos concluir que, posiblemente las intensidades lumínicas no tuvieron un efecto inhibitorio para el crecimiento de la microalga (Khoeyi, Seyfabadi, and Ramezanzpour 2012).



**Figura. 15** Dinámica de la intensidad luminica media perpendicular ( $I_5$ ), en la superficie del reactor ( $I_o$ ) e interna ( $I_a$ ) de los fotobiorreactores entre las 7 - 18 horas, durante los días de cultivo.

### Temperatura y humedad

Para entender las dinámicas de temperatura se hicieron medidas de ambiente, superficie del fotobiorreactor y al interior, y se observó que en promedio todas se encuentran entre 25 a 35 grados centígrados, tal y como se aprecia en la figura 16. Sin embargo el medio de cultivo conservo la temperatura durante la noche por lo cual la temperatura interna no baja de 28 grados centígrados. En el estudio se reportaron días de alta intensidad de luz, donde la temperatura alcanzada en la superficie del reactor llego a 38°C e internamente a 37°C, aunque es alta para la microalga utilizada no inhibió aparentemente su crecimiento. Es importante resaltar que estas temperaturas elevadas se presentaron por no más de 2 horas al día y el FBR conservo la temperatura durante las 4 horas consecutivas.

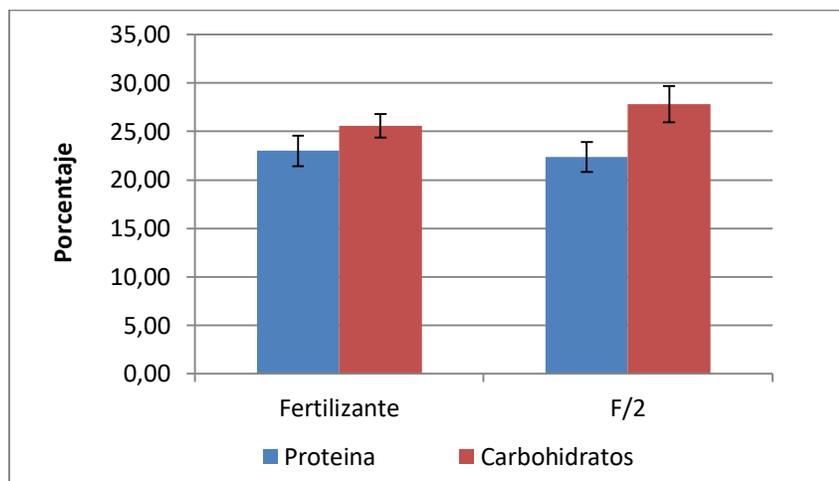


**Figura. 16** Dinámicas de las temperatura externa, en superficie e interna y humedad relativa entre las 6 - 18 horas

Van Wageningen y colaboradores (2012), concluyen que la temperatura óptima para el crecimiento de *Nannochloropsis salina* es de 26°C, e indicando que la tasa de crecimiento disminuye un 30% cuando las temperaturas son cercanas a 31°C (Van Wageningen et al. 2012). Por el contrario, en los resultados de esta investigación, la mayor concentración de biomasa que se obtuvo al aire libre con una temperatura media de 31°C la cual fue mayor que la obtenida en el laboratorio en donde la temperatura era de 23°C.

### Proteínas y carbohidratos

El fertilizante obtuvo más porcentaje de proteína y menor porcentaje de carbohidratos (23 y 26% respectivamente), que los obtenidos en el medio referencia (22 y 28% respectivamente), sin embargo los análisis estadísticos no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos tanto para proteínas como carbohidratos ( $p=0,60$  y  $0,23$ ), lo que indica que la integridad de la biomasa no se encuentra comprometida por la utilización del fertilizante agrícola.



**Figura. 17** Porcentaje de proteína y carbohidratos de la biomasa de *Nannochloropsis* sp. obtenida a partir del fertilizante agrícola y el medio comercial F/2 de Guillard, en fotobiorreactores al aire libre.

Tampoco disminuyó con respecto al montaje realizado en el laboratorio donde la biomasa obtuvo una cantidad de proteína del 21%, y esto en un fotoperiodo de 24 horas de luz, lo que indica que la disminución en la cantidad de horas luz tuvo un efecto positivo en el crecimiento de la microalga tanto en crecimiento como concentración proteica, lo cual es concordante a lo reportado en la literatura. Un estudio realizado sobre *Nannochloropsis gaditana* en el 2016 por Helena y colaboradores, halló que la producción de proteínas se ve favorecida en fotoperiodos 12:12, independiente que fueran cultivos mixotrofos o autotrofos, y concluyen que se puede manipular el metabolismo de la microalga y favorecer la acumulación de proteínas y lípidos, al modificar los periodos de luz/oscuridad. Un periodo prolongado de oscuridad promueve la acumulación de proteínas ya que el metabolismo no se dirige a replicación celular, ya que no hay fotosíntesis, así que la microalga dirige su energía a la biosíntesis de proteínas y pigmentos (Helena et al. 2016).

### 3.4 Costos del medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nannochloropsis* sp.

Los modelos de producción de biomasa microalgal que utilizan agua y CO<sub>2</sub> residuales de procesos que involucran sistemas de combustión como lo son las cementeras, reducen

los gastos de proceso a los costos del medio de cultivo. Un análisis del fertilizante utilizado, muestra una reducción de costos del 90% para la obtención de un kilogramo de biomasa microalgal, con respecto al medio comercial F/2 de Guillard (tabla 7), corroborando que los fertilizantes agrícolas pueden utilizarse como medio de cultivo de bajo costo para la producción de microalgas.

**Tabla 7.** Análisis de costos del medio de cultivo para la producción de biomasa microalgal.

	F/2 de Guillard	FERTILIZANTE
<b>Costo-litro de medio.( pesos/L)</b>	21,86	1,30
<b>Biomasa producida en 10 días de cultivo por litro(mg/L)</b>	350	200
<b>Costo kilogramo de biomasa (pesos/Kg)</b>	62,466	6,500

Según González (2014), en un estudio realizado en México, los costos de producir un kilogramo de biomasa de *Nannochloropsis* sp están alrededor de \$200.000 pesos Colombianos, incluyendo la mano de obra, energía y nutrientes. También presenta la mano de obra como el rubro de más demanda económica, seguido por los nutrientes y por último la energía(González 2014). De manera similar Cheng-wu (2001), estiman que la producción de un kilogramo de biomas de *Nannochloropsis* se encuentra entre \$165.000 y 360.000 pesos colombianos, dependiendo del crecimiento microalgal (Cheng-wu, Zmora, and Kopel 2001). Es importante destacar que estas estimaciones son dadas para modelos con fuente artificial de luz y medios de cultivos convencionales, y pueden disminuir al utilizar la luz solar y medios de cultivos alternativos, así mismo otros investigadores (Ramírez Duque 2017) sugiere que la tecnología debe mejorarse y adaptarse a las condiciones tropicales colombianas de la región donde se pretenda implementar, para aumentar la eficiencia en la captación de luz, aumentar la concentración celular y disminuir los costos de producción.

No obstante los costos para producir un kilogramo de biomasa, deben reducirse al menos 10 veces para poder ser competitivos con otras materias primas utilizadas en la fabricación de alimentos para animales. Las harinas de origen animal son utilizadas en

las formulaciones para la mayoría de las producciones animales. Estas harinas proveen de plantas de rendering donde se aprovechan los residuos de las plantas de sacrificio, lo cual implica retos microbiológicos altos, debido a que la materia de origen presenta algún grado de descomposición, diferente a la biomasa microalgal (Molina-Alvarado and Granados-Chinchilla 2015). La harina de carne presenta un porcentaje de proteína cercano a 45% y su precio de venta para la fabricación de concentrados está alrededor de \$1.800 pesos colombianos por kg (Agrosan 2018). Es posible que al evaluar diferentes factores como otros fertilizantes, un mayor inóculo, utilizar microalgas de mayor peso molecular o que tengan una mayor fijación de CO<sub>2</sub>, además del uso de fotobiorreactores con una alta relación S/V, pueden reducir en gran medida el costo de producción de la biomasa microalgal.

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

Se concluye que la microalga *Nannochloropsis* sp presenta una concentración de proteínas y carbohidratos buena para la alimentación animal (23 y 26 % respectivamente) cultivadas al aire libre.

Concentraciones de CO<sub>2</sub> al 3 % en los cultivos al aire libre en el municipio de Carepa en Fotobiorreactores tubulares favorecen el crecimiento de *Nannochloropsis* sp.

El uso de fertilizante agrícola reduce el costo de producción del medio de cultivo sin alterar la calidad de la biomasa microalgal comparado con el medio de referencia F/2 de Guillard.

Las condiciones ambientales de luz y la alta temperatura del Urabá Antioqueño (Carepa-Antioquia) permiten la producción de biomasa microalgal utilizando fertilizantes agrícolas como medio de cultivo en fotobiorreactores al aire libre.

*Nannochloropsis* sp mostro un buen desempeño en cultivos al aire libre (en relación a las condiciones de radiación y temperatura altas), alcanzando concentraciones de biomasa mayores a las obtenidas en el laboratorio.

Los costos del medio de cultivo para producir 1 kilogramo de biomasa microalgal se pueden reducir en un 90% al reemplazar el medio de cultivo convencional (F/2 de Guillard) por fertilizantes agrícolas como el FER MASTER 13-40-13.

### 4.2 Recomendaciones

Se recomienda hacer estudios en fertilizantes de bajo costo como granulados, y que contengan diferentes tipos de fuente de nitrógeno como nitratos o urea, y evaluar el efecto en el porcentaje de proteínas, carbohidratos y lípidos.

De igual forma se recomienda evaluar otras dinámicas de inyección de CO<sub>2</sub> en términos de concentración (evaluar el intervalos intermedios de 3 a 6%) y pulsaciones (tiempos de apagado y prendido) que permitan mantener un control del pH en el medio de cultivo.

Investigar otros modos de operación del cultivo como lotes alimentados o continuos al aire libre, ya que podrían aumentar la concentración de biomasa final y disminuir costos, además de aumentar la capacidad de producción.

Realizar aislamientos de microalgas de la zona ya que estarían adaptadas a las condiciones climáticas e inducir con otros factores (CO<sub>2</sub>, nutrientes entre otros) el aumento de su capacidad productiva.

## **A. Anexo: protocolo de cuantificación de biomasa por peso seco.**

Es una medida muy importante ya que de esta se pueden extraer más parámetros como rendimientos de sustrato y productividad volumétrica, los cuales son influyentes a la hora de evaluar un proceso comercialmente.

### **Materiales y equipos**

- Balanza analítica
- Desecador
- Horno o balanza de humedad
- Equipo de filtración
- Bomba de vacío
- Membranas de filtración de 0,45  $\mu\text{m}$  (fibra de vidrio, celulosa o hemicelulosa)
- Agua destilada
- Pinzas
- Muestra de microalgas (50ml)

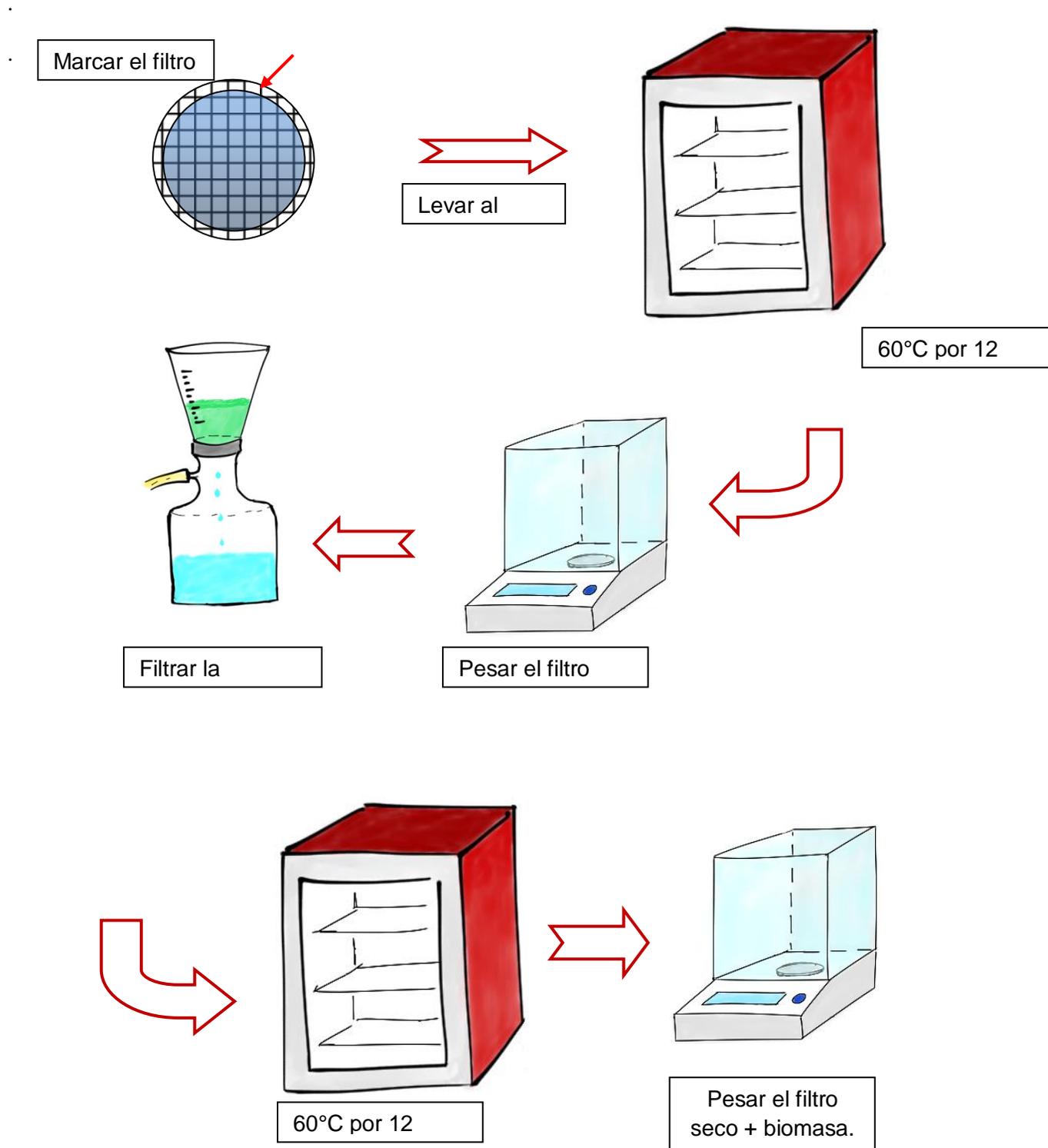
### **Procedimiento**

- Se toman las membranas de filtración y se marcan según la muestra
- Se dejan secar en el horno a una temperatura de 60 ° C por 12 horas y se pasan al desecador por 15 minutos luego se registra el peso de cada una. (Se registra como peso del filtro en mg)

- Se toma un volumen conocido de la muestra y se hace pasar por la membrana de filtración, con la ayuda del equipo de filtración y la bomba de vacío. (Se registra el volumen de la muestra en ml)
- Se hace un lavado con agua destilada para retirar las sales del medio.
- Luego se pasan las membranas al horno por 12 horas a la temperatura anterior y se pasan al desecador por 15 minutos luego se registra el peso de cada una. (se registra como el peso del filtro con biomasa en mg)
- El peso seco se calcula utilizando la siguiente fórmula

$$\text{peso seco (g/L)} = \frac{\text{peso del filtro con biomasa} - \text{peso del filtro}}{\text{volumen de la muestra}}$$

### Diagrama del proceso





## **B. Anexo: Protocolo de cuantificación de proteínas y carbohidratos en biomasa seca.**

La calidad de la biomasa microalgal se puede determinar al obtener la cantidad de proteínas, lípidos y carbohidratos que presenta, lo cual es importante a la hora de utilizar esta biomasa como alimento para otros organismos.

### **Cuantificación de proteínas en microalgas por el método de Lowry (Essmann 2011)**

#### **Equipos:**

- Tubos de ensayo
- Micropipetas 1000 y 100  $\mu\text{L}$
- Sonificador.
- Espectrofotómetro.

#### **Reactivos:**

- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5% (P/V)
- Tartrato de sodio y potasio al 2% (P/V)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1% (P/V)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- $\text{NaOH}$  (1M)
- Albúmina de suero bovino (ABS)
- Agua destilada

- 10 mg de biomasa seca
- Preparación de Reactivos:

**Reactivo A:** Preparar inmediatamente antes de usar. Mezclar 50 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5% con 2,4 mL de una solución 1:1 de tartrato sódico y potásico al 2% y  $\text{CuSO}_4$  al 1%.

**Reactivo B:** Diluir el reactivo de Folin-Ciocalteu con agua destilada en una proporción 1:1.

### **Procedimiento:**

Disrupción celular:

- Obtener aproximadamente 10 mg de Biomasa seca.
- Diluir ésta en 10 mL de NaOH (1M) y agitar.
- Sonicar durante 30 minutos.

**Nota:** Para la disrupción celular de microalgas filamentosas, se recomienda llevar a cabo el proceso de sonicación durante aproximadamente 1 hora.

### **Método de Lowry:**

- Tomar 0,1 mL de muestra y diluir en 0,3 mL de NaOH (1M) y 0,4 mL de agua destilada.
- Añadir 2 mL de reactivo A, agitar y esperar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 0,4 mL de reactivo B, agitar y dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia de la muestra a 750nm, teniendo como blanco un tubo tratado de igual forma, sin la adición de biomasa.

### **Curva de calibración:**

La curva de calibración se realizó con soluciones de Albúmina de suero bovino (ABS), con mínimo 5 puntos de concentración conocida entre 0 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ABS en agua destilada. Se llevó a cabo el Método de Lowry para cada solución y se midió la

absorbancia a 750 nm. Adicionalmente, preparar una solución control para la validación de la curva.

## Cuantificación de carbohidratos en microalgas por el método de Dubois (Romero 2010)

### Equipos

- Tubos de ensayo
- Micropipetas de 100 y 1000  $\mu\text{L}$
- Sonicador.
- Espectrofotómetro.

### Reactivos:

- Glucosa
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98% (v/v)
- Solución de Fenol
- NaOH (1M)
- Agua destilada
- 10 mg de biomasa seca

### Procedimiento:

- Disrupción Celular:
- Obtener aproximadamente 10 mg de Biomasa seca.
- Diluir ésta en 10 mL de NaOH (1M) y agitar.
- Sonicar durante 30 minutos.

**Nota:** Para la disrupción celular de microalgas filamentosas, se recomienda llevar a cabo el proceso de sonicación durante aproximadamente 1 hora.

### Método de Dubois:

- Tomar 0,1 mL de muestra, añadir 0,9 mL de agua destilada.
- Adicionar 25  $\mu$ L de una solución de fenol y agitar muy bien.
- Agregar 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98% (v/v) y agitar hasta que se presente un cambio de coloración.
- Dejar reaccionar durante 30 minutos y medir absorbancia a 480 nm, teniendo como blanco un tubo con 0,1 mL de NaOH y 0,9 mL de agua destilada, tratado de la misma forma.

**Curva de calibración:**

La curva de calibración se realizó con soluciones de glucosa, con mínimo 5 puntos de concentración conocida entre 0 y 1000  $\mu$ g/mL de glucosa en NaOH (1M). Se llevó a cabo el Método de Dubois para cada solución y se midió la absorbancia a 480 nm. Adicionalmente, preparar una solución control para la validación de la curva.



## C. Anexo: Determinación de la constante de extinción ( $K_a$ ) para microaglas.

En un cultivo bien homogenizado, la biomasa genera un efecto de disipación de la luz y que puede aumentar con la concentración de la biomasa, generando un perfil de la luz en el cultivo (Acién Fernández et al. 1997). Dicho efecto se puede expresar mediante la ecuación de la *ley de Lambert-Beer*.

$$(E3) I(\lambda) = I_o(\lambda) \cdot \exp(-K_a(\lambda) \cdot X \cdot L)$$

$$(E4) A(\lambda) = K_a(\lambda) \cdot X \cdot L$$

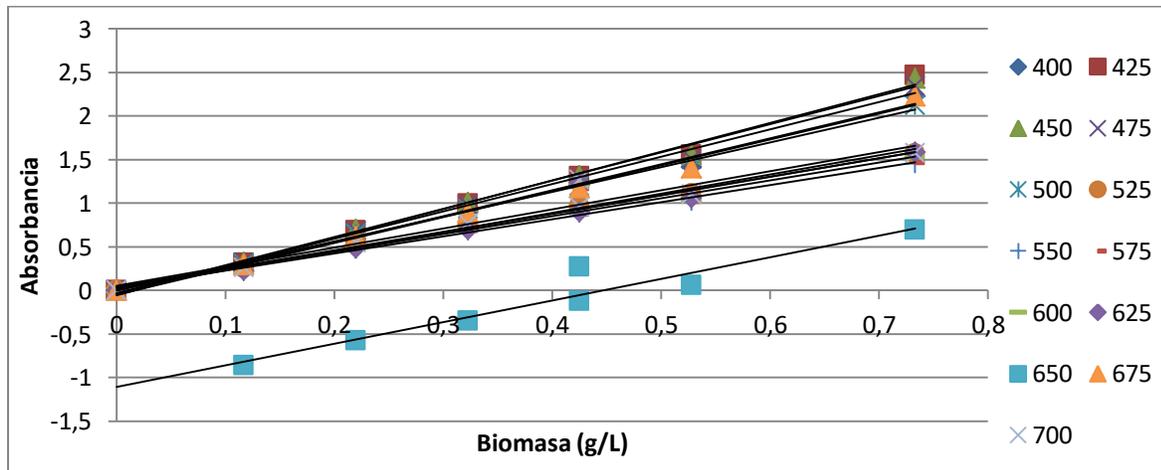
Por lo tanto, se puede determinar el valor de  $K_a$  si graficamos  $A(\text{abs})$  vs  $X(\text{g/L})$ , con la ayuda de un espectrofotómetro pero a una longitud de onda específico  $\lambda$  (nm). Pero debemos tener en cuenta que la absorbancia cambia dependiendo de la longitud de onda. Por lo tanto lo que se recomienda para lograr un  $K_a$  muy aproximado es obtener un valor promedio de  $K_a$  a diferentes longitudes de onda y a diferentes concentraciones de biomasa. El procedimiento puede ser así:

1. Realizar una tabla con longitudes de onda ( $\lambda$ ) del visible 400-700 nm, diferentes concentraciones de biomasa y como blanco el agua.
2. Obtener los valores de Absorbancia para cada concentración de biomasa en diferentes longitudes de onda del visible.
3. Determinar para cada absorbancia el valor de  $K_a$  ( $\text{m}^2/\text{g}$ ), estableciendo que la longitud de la celda del espectro ( $L$ ) es de 1cm y el valor de la concentración de biomasa en  $\text{kg}/\text{m}^3$ .
4. Obtener un valor promedio de  $K_a$  por cada muestra.
5. Obtener un valor promedio de  $K_a$  entre las muestras, este será nuestro  $K_a$ .

Nota: El valor de  $K_a$  se convierte en un parámetro específico de la microalga y dependiendo de los pigmentos que se encuentren en la biomasa del cultivo, se puede determinar un  $K_a$  en función de los pigmentos microalgales (Molina-Grima et al. 1994).

### Determinación experimental

Se realizaron mediciones de absorbancia en longitudes de onda entre 400 a 700 nm, a cultivos de *Nannochloopsis* sp a diferentes concentraciones celulares ( $x$ ).



**Figura.18** absorbancia de cultivos de *Nannochloopsis* sp a diferentes concentraciones celulares, en longitudes de onda entre 400 a 700 nm.

Para cada una de las longitudes de onda se calculo el  $K_a$  utilizando la ecuación 2, luego se hizo un promedio de entre todos para hallar la constante de extinción de la cepa microalgal utilizada (*Nannochloopsis* sp) (Tabla 8)

**Tabla 8.** Constante de extinción de *Nannochloropsis* sp, en longitudes de onda entre 400 y 700nm

Longitud de onda ( $\lambda$ )	Constante de extinción (Ka)
400	7,44
425	7,74
450	7,20
475	6,59
500	5,68
525	4,03
550	3,56
575	3,35
600	3,34
625	3,31
650	3,62
675	4,40
700	2,94
<b>Promedio</b>	4,86

Dado lo anterior la constante de extinción utilizada para la determinación de la intensidad luminica disponible al interior del reactor fue de 4,86

## D. Anexo: Determinación de la intensidad media en la superficie del reactor ( $I_0$ ).

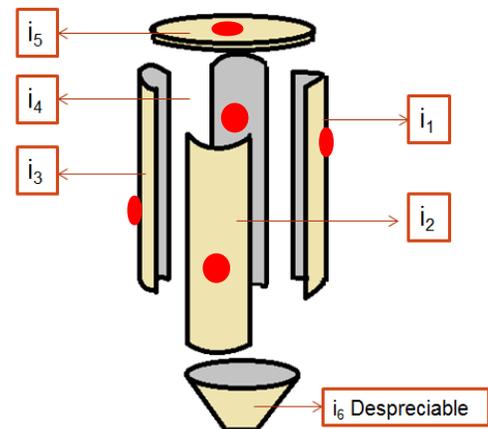
Se tomaron 2 reactores ubicados a los extremo del área de cultivo, para hacer mediciones de la intensidad lumínica en la superficie de los reactores, en 5 puntos de medición por reactor, como lo muestra la figura 19. Para establecer la intensidad lumínica promedio se dividió la superficie del reactor en 6 fragmentos y se despreció la intensidad lumínica recibida en la base cónica del reactor.

La intensidad media recibida en la pared del reactor ( $I_0$ ) se calculó con la formula.

$$I_0 = [Sl(i_1 + i_2 + i_3 + i_4) + Ss(i_5)]/St$$

Dónde:

- $i$  es la intensidad medida en cada lateral
- $Ss$  es el área superficial de la cara superior
- $Sl$  es el área superficial de una cara lateral
- $St$  es el área superficial total del reactor sin incluir la base cónica.



**Figura.19** puntos de muestreo de intensidad lumínica para los reactores al aire libre

## E. Anexo: Estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron en el software R studio.

### Objetivo 1

- Análisis de varianza de la concentración de biomasa obtenida a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>, en el día 4

#### Shapiro-Wilk normality test

```
data: mod4$residuals
W = 0.88997, p-value = 0.1695
```

#### Levene test

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value Pr(>F)
group 2  0.0024 0.9976
      7
```

#### Anova

```
Analysis of Variance Table
```

```
Response: dat4$Biomasa
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
dat4$Tratamiento 2 2218.7 1109.34  2.3212 0.1685
Residuals       7 3345.4  477.92
```

- Análisis de varianza de la concentración de biomasa obtenida a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>, en el día 8.

### Shapiro-Wilk normality test

```
data: mod8$residuals
W = 0.96608, p-value = 0.8444
```

### Levene test

```
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 2  3.7147 0.07227 .
      8
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

### Anova

```
Analysis of Variance Table
```

```
Response: log(dat8$Biomasa)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
dat8$Tratamiento  2 0.70755  0.35378  5.6161 0.02994 *
Residuals        8 0.50394  0.06299
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
HSD.test(mod8, 'dat8$Tratamiento', console=T)
```

```
Study: mod8 ~ "dat8$Tratamiento"
```

### HSD Test

```
Mean Square Error: 0.06299295
```

```
dat8$Tratamiento, means
```

	log.dat8.Biomasa.	std r	Min	Max
0.022%	4.647373	0.1019398	3 4.532599	4.727388
3%	5.286913	0.1844047	4 5.093750	5.451038
6%	5.062930	0.3564383	4 4.624973	5.438079

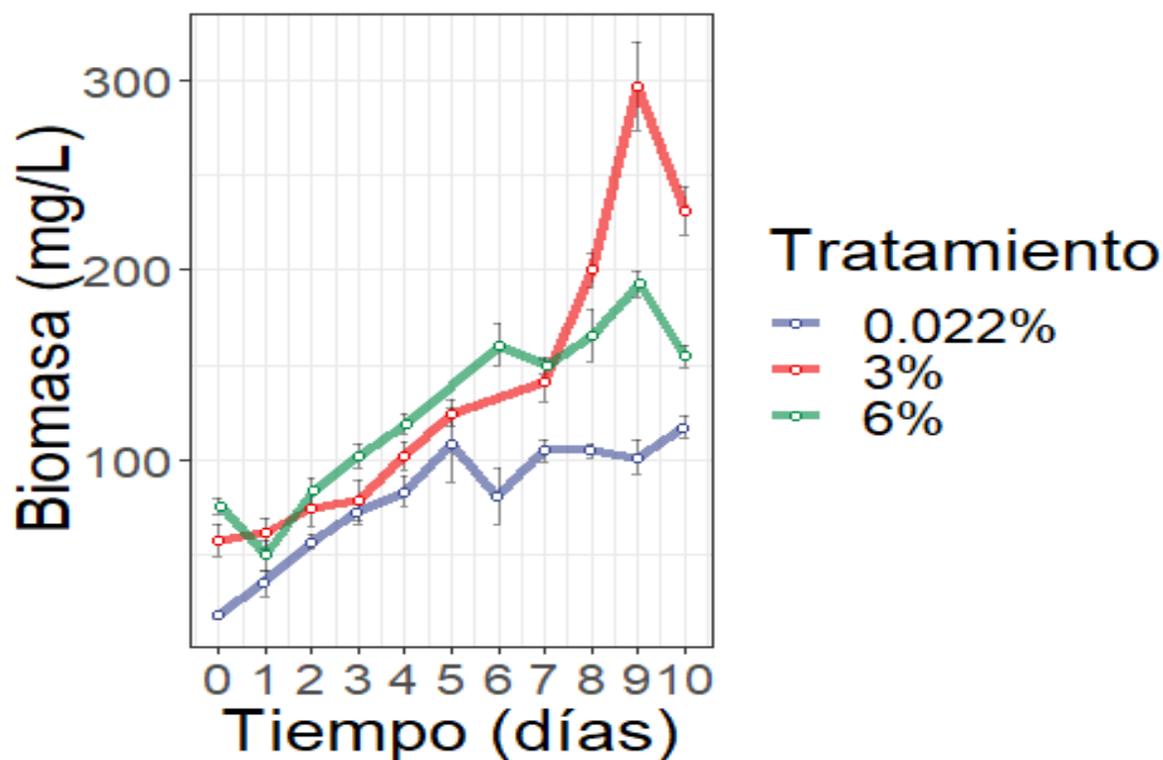
```
Alpha: 0.05 ; DF Error: 8
```

```
Critical Value of Studentized Range: 4.041036
```

Groups according to probability of means differences and alpha level( 0 .05 )

Treatments with the same letter are not significantly different.

	log(dat8\$Biomasa)	groups
3%	5.286913	a
6%	5.062930	ab
0.022%	4.647373	b



**Figura. 20.** Crecimiento de *Nannochloropsis* sp en 3 concentraciones de biomasa microalgal.

- Análisis de varianza de la tasa de crecimiento del cultivo microalgal a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>.

### Shapiro-Wilk normality test

##

```
## data: modMiu$residuals
## W = 0.87751, p-value = 0.09672
```

### Levene test

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 2  0.0982 0.9075
##      8
```

### Anova

```
##
## Response: dat1.1$mu
##      Df  Sum Sq  Mean Sq F value Pr(>F)
## dat1.1$Tratamiento 2 0.012362 0.0061811  1.1895  0.353
## Residuals          8 0.041570 0.0051963
```

- Análisis de varianza del porcentaje de proteína de la biomasa obtenida a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>.

### Shapiro-Wilk normality test

```
##
## data: modP$residuals
## W = 0.90419, p-value = 0.2773
```

### Levene test

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 2  0.2027 0.8219
##      6
```

### Anova

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: dat1.1$Proteina
##      Df  Sum Sq  Mean Sq F value  Pr(>F)
## dat1.1$Tratamiento 2 0.00208495 0.00104247  14.451 0.005081 **
## Residuals          6 0.00043283 0.00007214
```

### HSD Test

```
##
```

```
## Mean Square Error: 7.213889e-05
##
## dat1.1$Tratamiento, means
##
##      dat1.1.Proteina      std r      Min      Max
## 0.022%      0.1120667 0.006213158 3 0.1061 0.1185
## 3%          0.1297667 0.011877851 3 0.1161 0.1376
## 6%          0.0925000 0.006060528 3 0.0858 0.0976
##
## Treatments with the same letter are not significantly different.
##
##      dat1.1$Proteina groups
## 3%          0.1297667      a
## 0.022%      0.1120667      ab
## 6%          0.0925000      b
```

- Análisis de varianza del porcentaje de carbohidratos de la biomasa obtenida a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>.

### Shapiro-Wilk normality test

```
##
## data: modCa$residuals
## W = 0.8762, p-value = 0.1431
```

### Levene test

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 2  2.4474  0.167
##      6
```

### Anova

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: dat1.1$Carbohidratos
##      Df      Sum Sq      Mean Sq F value Pr(>F)
## dat1.1$Tratamiento  2 0.00093023 0.00046511  4.4271 0.0659 .
## Residuals          6 0.00063036 0.00010506
## ---
```

## Objetivo 2

- Análisis de varianza de la concentración de biomasa obtenida en diferentes niveles de fertilizantes al día 4.

### Shapiro-Wilk normality test

```
##
## data:  mod4.2$residuals
## W = 0.97098, p-value = 0.8542
```

### Levene test

```
t## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 3  1.5776 0.2462
##      12
```

### Anova

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: dat4.2$Biomasa
##              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## dat4.2$Tratamiento  3  17702  5900.6  3.5301 0.04854 *
## Residuals          12  20058  1671.5
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

### LSD.test

```
## LSD t Test for dat4.2$Biomasa
##
## dat4.2$Tratamiento, means and individual ( 95 %) CI
##
##           dat4.2.Biomasa      std r      LCL      UCL  Min  Max
## Control           64.625 27.92363 4  20.0858 109.1642 26.0  87.5
## Tratamiento a     145.000 20.71634 4 100.4608 189.5392 122.5 170.0
## Tratamiento b     138.750 31.72144 4  94.2108 183.2892 107.5 182.5
## Tratamiento c     140.000 66.86429 4  95.4608 184.5392  52.5 210.0
##
## Alpha: 0.05 ; DF Error: 12
## Critical Value of t: 2.178813
##
## least Significant Difference: 62.98795
```

```
##
## Treatments with the same letter are not significantly different.
##
##           dat4.2$Biomasa groups
## Tratamiento a      145.000    a
## Tratamiento c      140.000    a
## Tratamiento b      138.750    a
## Control            64.625    b
```

- Análisis de varianza de la concentración de biomasa obtenida en diferentes niveles de fertilizantes al día 8.

### Shapiro-Wilk normality test

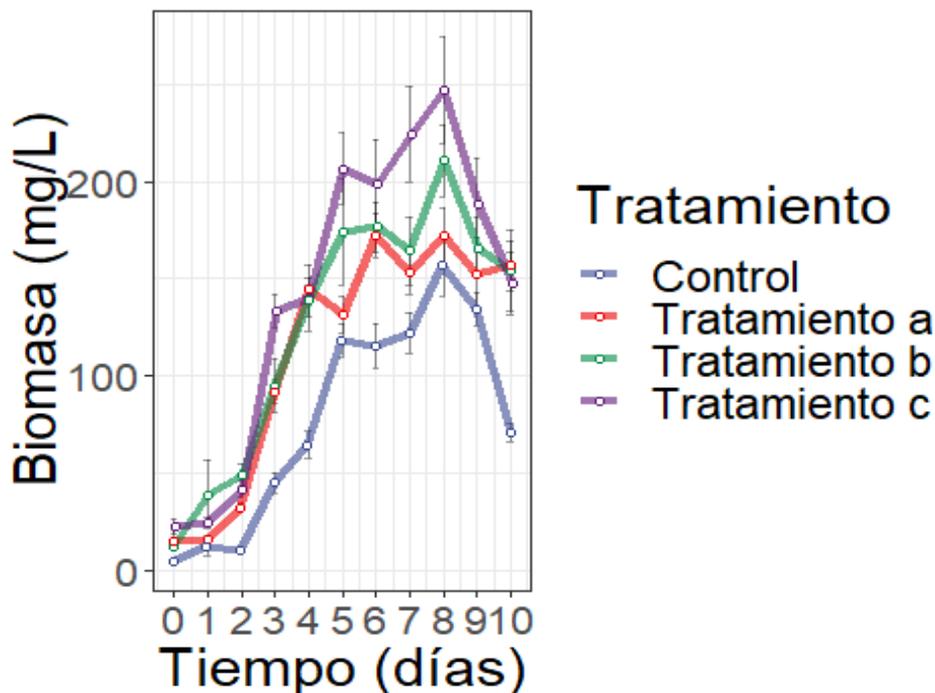
```
## data: mod8$residuals
## W = 0.96721, p-value = 0.7917
```

### Levene test

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 2  5.704 0.02887 *
##      8
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

### Anova

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: dat8.2$Biomasa
##      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## dat8.2$Tratamiento  3  19606  6535.2  1.0638 0.4007
## Residuals          12  73717  6143.0
```



**Figura. 21.** Crecimiento de *Nannochloropsis* sp en diferentes concentraciones de fertilizante.

- Análisis de varianza de la tasa de crecimiento del cultivo microalgal a diferentes concentraciones de Fertilizante.

#### Shapiro-Wilk normality test

```
##
## data:  modMiu$residuals
## W = 0.96016, p-value = 0.6648
```

#### Levene test

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 3  3.7093 0.04257 *
##      12
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

#### Anova

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: dat2.1$Tasa
##              Df  Sum Sq  Mean Sq F value Pr(>F)
```

```
## dat2.1$Tratamiento 3 0.030524 0.0101748 2.2692 0.1327
## Residuals          12 0.053806 0.0044839
```

- Análisis de varianza del porcentaje de proteína de la biomasa obtenida a diferentes concentraciones Fertilizante.

### Shapiro-Wilk normality test

```
##
## data: modP$residuals
## W = 0.92546, p-value = 0.3345
```

### Levenetest

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 3  1.0098 0.4373
##      8
```

### Anova

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: dat2.1$Proteina
##      Df    Sum Sq   Mean Sq F value    Pr(>F)
## dat2.1$Tratamiento 3 0.0177629 0.0059210  19.354 0.0005029 ***
## Residuals          8 0.0024474 0.0003059
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

### HSD.test

```
##
## Study: modP ~ "dat2.1$Tratamiento"
##
## HSD Test for dat2.1$Proteina
##
## Mean Square Error: 0.0003059234
##
## dat2.1$Tratamiento, means
##
##      dat2.1.Proteina      std r      Min      Max
## Control          0.2030268 0.005598263 3 0.1966452 0.2071103
## Tratamiento a      0.1126302 0.005352783 3 0.1065139 0.1164598
## Tratamiento b      0.1800814 0.025784390 3 0.1509871 0.2001033
## Tratamiento c      0.2100428 0.022335303 3 0.1871555 0.2317818
##
## Alpha: 0.05 ; DF Error: 8
```

```
## Critical Value of Studentized Range: 4.52881
##
## Minimun Significant Difference: 0.04573301
##
## Treatments with the same letter are not significantly different.
##
##           dat2.1$Proteina groups
## Tratamiento c      0.2100428      a
## Control            0.2030268      a
## Tratamiento b      0.1800814      a
## Tratamiento a      0.1126302      b
```

- Análisis de varianza del porcentaje de carbohidratos de la biomasa obtenida a diferentes concentraciones de Fertilizante.

#### Shapiro-Wilk normality test

```
##
## data: modCa$residuals
## W = 0.85625, p-value = 0.04389
```

#### Levene test

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 3  0.1077 0.9532
##      8
```

#### Anova

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: dat2.1$Carbohidratos
##           Df      Sum Sq   Mean Sq F value Pr(>F)
## dat2.1$Tratamiento 3 0.00014742 4.9141e-05  1.3146 0.3353
## Residuals         8 0.00029906 3.7382e-05
```

### Objetivo 3

- Análisis de varianza de la biomasa microalgal obtenida en F/2 de Guillard y fertilizante, al aire libre.

#### Shapiro-Wilk normality test

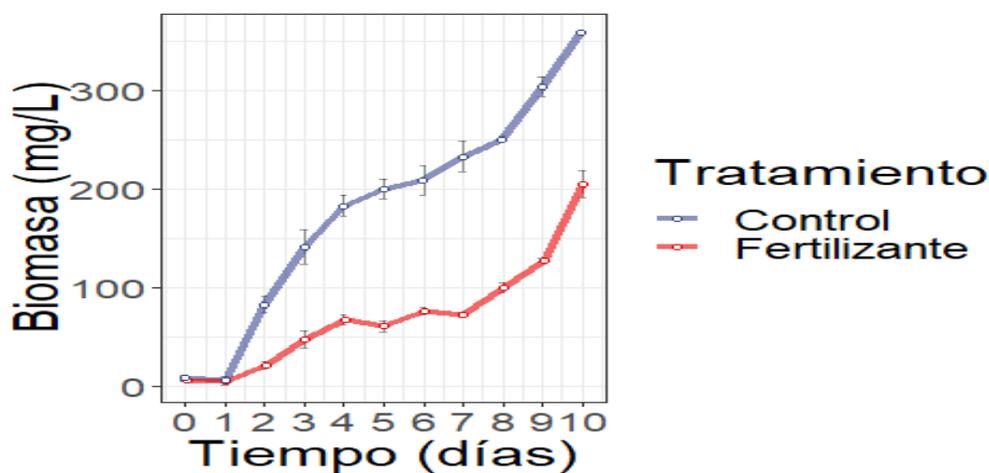
```
##
## data: mod8$residuals
## W = 0.81136, p-value = 0.05296
```

#### Levene test

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 1  3.6545 0.1141
##      5
```

#### T.test

```
##
## Two Sample t-test
##
## data: dat10$Biomasa by dat10$Tratamiento
## t = 4.8708, df = 5, p-value = 0.004589
## alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
## 95 percent confidence interval:
##  72.51034 234.57299
## sample estimates:
##      mean in group Control mean in group Fertilizante
##                   358.3333                   204.7917
```



**Figura. 22.** Crecimiento de *Nannochloropsis* sp en en F/2 de Guillard y fertilizante, al aire libre.

- Análisis de varianza de la tasa de crecimiento del cultivo microalgal en diferentes medios de cultivo al aire libre.
- Análisis de varianza del porcentaje de proteína de la biomasa obtenida en diferentes medios de cultivo al aire libre.

### Shapiro-Wilk normality test

```
## data: modP$residuals
## W = 0.88839, p-value = 0.2261
```

### Levene test

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 1  0.069 0.8016
##      6
```

### Anova

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: dat3.1$Proteina
##      Df      Sum Sq   Mean Sq F value Pr(>F)
## dat3.1$Tratamiento  1 0.00007501 7.5013e-05    0.3 0.6036
## Residuals          6 0.00150026 2.5004e-04
```

- Análisis de varianza del porcentaje de carbohidratos de la biomasa obtenida en diferentes medios de cultivo al aire libre.

### Shapiro-Wilk normality test

```
##
## data: modCa$residuals
## W = 0.96734, p-value = 0.8763
```

### Levene test

---

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 1  0.681 0.4408
##      6
```

## Anova

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: dat3.1$Carbohidratos
##      Df      Sum Sq   Mean Sq F value Pr(>F)
## dat3.1$Tratamiento  1 0.00088368 0.00088368  1.7542 0.2336
## Residuals          6 0.00302246 0.00050374
```

## Bibliografía

- A. Ilavarasi, D. Mubarakali, R. Praveenkumar, E. Baldev and N. Thajuddin. 2011. "Optimization of Various Growth Media to Freshwater Microalgae for Biomass Production." *Biotechnology* Volume 10.
- Abdel-raouf, N, A.A Al-Homaidan, and I.B.M Ibraheem. 2012. "Microalgae and Wastewater Treatment." *Saudi Journal of Biological Sciences* 19(3): 257–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>.
- Acién Fernández, F.G et al. 1997. "A Model for Light Distribution and Average Solar Irradiance Inside Outdoor Tubular Photobioreactors for the Microalgal Mass Culture." *Biotechnol Bioeng* 55: 701–14.
- Alfaro, Orlando, Alina Ugás, and Annia Miralles. 2008. "VALORACIÓN ECONÓMICA DEL USO DE LA BIOMASA MIXTA DE *Chlorella* Sp. COMO BASE PROTEICA EN PIENSOS LÍQUIDOS PARA LA CEBA DE CERDOS." *TECNOLOGÍA QUÍMICA* XXVIII, No.
- Andrade, Charity E, Alexandra L Vera, Carmen H Cárdenas, and Ever D Morales. 2009. "Biomass Production of Microalga *Scenedesmus* Sp. with Wastewater from Fishery." *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia* 32(2): 126–34.
- Barajas, Andrés Fernando. 2010. 1 The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference *ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DEL SUMINISTRO DE CO2 EN EL CRECIMIENTO DE LAS MICROALGAS EN UN FOTOBIOREACTOR A ESCALA LABORATORIO*.
- Bartley, Meridith L. et al. 2013. "pH Effects on Growth and Lipid Accumulation of the Biofuel Microalgae *Nannochloropsis Salina* and Invading Organisms." *Biomass and Bioenergy* 54: 83–88.
- Blanken, Ward et al. 2016. "Predicting Microalgae Growth." *Algal Research* 14: 28–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.12.020>.
- Bouterfas, Radia, Mouhssine Belkoura, and Alain Dauta. 2002. "Light and Temperature Effects on the Growth Rate of Three Freshwater Algae Isolated from a Eutrophic Lake." *Hydrobiologia* 489(1): 207–17.
- Cabello, Juan, Marcia Morales, and Sergio Revah. 2017. "Carbon Dioxide Consumption of the Microalga *Scenedesmus Obtusiusculus* under Transient Inlet

- CO<sub>2</sub>concentration Variations.” *Science of the Total Environment* 584–585: 1310–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.002>.
- Campaña-Torres, Alfredo et al. 2012. “Productive Response of *Nannochloropsis Oculata*, Cultured in Different Media and Their Efficiency as Food for the Rotifer *Brachionus Rotundiformis* Respuesta Productiva de *Nannochloropsis Oculata* , Cultivada En Diferentes Medios Y Su Eficiencia.” *International Journal of Experimental Botany* 9457(81): 45–50.
- Casal Bejarano, Carlos. 2010. “Caracterización de La Radiación Ultravioleta En La Provincia de Huelva E Incidencia En La Productividad Yel Valor Biotecnológico de Cultivos de Interés Comercial.” *Universidad de Huelva*: 1–227.
- Cetmar et al. 2012. *Diagnóstico Y Estrategias Para La Promoción de Un Desarrollo Socioeconómico Equitativo de La Costa Antioqueña, Con Énfasis En Sis Recursos Marinos Y Costeros. ERICA*.
- Cheng-wu, Zhang, Odi Zmora, and Reuven Kopel. 2001. “An Industrial-Size Flat Plate Glass Reactor for Mass Production of *Nannochloropsis Sp .* (Eustigmatophyceae).”
- Cheng, Lihua, Lin Zhang, Huanlin Chen, and Congjie Gao. 2006. “Carbon Dioxide Removal from Air by Microalgae Cultured in a Membrane-Photobioreactor.” *Separation and Purification Technology* 50(3): 324–29.
- Chiu, Sheng-Yi et al. 2015. “Cultivation of Microalgal *Chlorella* for Biomass and Lipid Production Using Wastewater as Nutrient Resource.” *Bioresource Technology* 184: 179–89. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414016927>.
- Codina, Mf, Cb García, and Jh Barón. 2012. “Planta Piloto de Microalgas Para Mejoramiento Del Tratamiento Efluentes Urbanos En Catamarca, Argentina.” *researchgate* (May). [http://mfjvohp.ina.gov.ar/pdf/ifrrhh/02\\_012\\_Codina.pdf](http://mfjvohp.ina.gov.ar/pdf/ifrrhh/02_012_Codina.pdf).
- Córdova, Luis R Martínez et al. 2010. “Alimento Natural En Acuicultura: Una Revisión Actualizada.” *Universidad Autónoma de Nuevo León Martínez Córdova*: 668–99.
- Das, Probir, Wang Lei, Siti Sarah, and Jeffrey Philip. 2011. “Enhanced Algae Growth in Both Phototrophic and Mixotrophic Culture under Blue Light.” *Bioresource Technology* 102(4): 3883–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.102>.
- Dubois, Michel et al. 1956. “Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.” *ANALYTICAL CHEMISTRY VOLUME 28*,: 350–56.
- Essmann, Prieto M. K. 2011. Universidad Austral de Chile “Determinación de Parametros Biológicos de La Microalga *Isochysis AFF. Galbana*: Comparación de Un

- Fotobioreactor Continuo VS Un Cultivo Batch.” <http://eprints.utas.edu.au/4774/>.
- FAO, and IFA. 2002. *Los Fertilizantes Y Su Uso*.
- Fernanda, María, and Pereira Gutiérrez. 2017. “Cultivo de Microalgas Isochrysis Galbana Y Nannochloropsis Sp . Para Alimentación de Larvas de Peces Marinos.” *Mutis*.
- gallardo Rodriguez, Juan Jose. 2009. “Ingeniería de Bioprocesos En El Cultivo de Dinoflagelados.” Universidad de Almería.
- García, Lorena Martínez. 2009. “ELIMINACIÓN DE CO2 CON MICROALGAS AUTÓCTONAS.” UNIVERSIDAD DE LEÓN.
- Go, Sugeun, Seok Joo Lee, Gwi Taek Jeong, and Sung Koo Kim. 2012. “Factors Affecting the Growth and the Oil Accumulation of Marine Microalgae, Tetraselmis Suecica.” *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35(1–2): 145–50.
- Gómez, Mario a Colorado, Diego a Moreno Tirado, and Jérica L Pérez. 2013. “Desarrollo , Producción Y Beneficio Ambiental de La Producción de Microalgas.” *Ambiente y Desarrollo* 17(32): 113–26.
- Gómez Aguirre, Ana María, and Sandra Turbay. 2016. “Relación de Una Comunidad de Pescadores Del Golfo de Urabá ( Colombia ) Con Los Ecosistemas de Manglar Y Su Conservación \*.” *Revista de Estudios Sociales* 12(2): 1–15.
- González, Omar Guillermo Montes. 2014. “Efecto de La Intensidad de La Luz Y de La Tasa de Inyección de Aire En El Crecimiento Y La Productividad de La Microalga Nannochloropsis Sp., Cultivada En Un Biorreactor Plano.” CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA Programa.
- Guayara, Jeison A, Paula Henao, and Alejandro Acosta. 2014. “CRECIMIENTO DE Chlorella Sorokiniana SOBRE AGUAS RESIDUALES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA MICROALGAL.” Universidad de Antioquia.
- Helena, Elisa et al. 2016. “Effects of Different Photoperiod and Trophic Conditions on Biomass , Protein and Lipid Production by the Marine Alga Nannochloropsis Gaditana at Optimal Concentration of Desalination ... Bioresource Technology Effects of Different Photoperiod and Trophic Conditions on Biomass , Protein and Lipid Production by the Marine Alga Nannochloropsis Gaditana at Optimal Concentration of Desalination Concentrate.” (October 2017).
- Henriques, M, a Silva, and J Rocha. 2007. “Extraction and Quantification of Pigments

- from a Marine Microalga : A Simple and Reproducible Method.” *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*: 586–93.
- Hernández, Alexis, and Jose Labbé. 2014. “Microalgas, Cultivo Y Beneficios.” *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49: 157–73.
- Howe, Barbara. 2012. “NANNOCHLOROPSIS OCULATA: A SAFE PROTEIN FEED FOR GROWING RATS AND RABBITS.”
- Huarachi Olivera, Ronald Eleazar et al. 2015. “Cultivo de *Arthrospira Platensis* (Spirulina) En Fotobiorreactor Tubular Doblemente Curvado a Condiciones Ambientales En El Sur Del Perú.” *Revista Colombiana de Biotecnología* 17(1): 143–50.  
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/50679>.
- Huesemann, M et al. 2016. “A Validated Model to Predict Microalgae Growth in Outdoor Pond Cultures Subjected to Fluctuating Light Intensities and Water Temperatures.” *ALGAL* 13: 195–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.008>.
- Javanmardian, Mino, and Bernhard Palsson. 1991. “High-Density Photoautotrophic Algal Cultures: Design, Construction, and Operation of a Novel Photobioreactor System.” *Biotechnology* 38(1): 1182–1189.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260381010/abstract>.
- Khoeyi, Zahra Amini, Jafar Seyfabadi, and Zohreh Ramezanzpour. 2012. “Effect of Light Intensity and Photoperiod on Biomass and Fatty Acid Composition of the Microalgae, *Chlorella Vulgaris*.” *Aquaculture International* 20(1): 41–49.
- Leal Flórez, Jenny et al. 2017. “Pesca, Familias Y Territorios En El Mar. Construcción Colectiva de Conocimiento Para El Ordenamiento Pesquero Del Golfo de Urabá.” Universidad de Antioquia.
- Lee, James Weifu. 2013. *Advance Biofuels and Bioproducts. Vol 1 Advanced Biofuels and Bioproducts*. <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4614-3348-4>.
- López, Elías, R González, Márquez-E Ríos, and W Torres-Arreola. 2015. “Efecto de La Concentración Y Fuentes de Nitrógeno En La Producción de Proteínas de Cultivos Masivos de La Microalga *Chaetoceros Muelleri*.” 9457(3): 331–37.
- Lowry, Oliver H., Nira J Rosebrough, Rose J Randall, and A Lewis. 1951. “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.” Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri.
- Lubián, L M. 1982. “*Nannochloropsis Gaditana* Sp. Nov., Una Nueva Eustig ;

- Natophyeeae Marina." *Lazaroa* 293: 287–93.
- Machado, Francisco Campillo. 2014. *ANÁLISIS DE PREFACTIBILIDAD PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UNA PLANTA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA A PARTIR DE MICROALGAS EN COLOMBIA*.
- Martínez, Gustavo Raúl Reyna. 2012. "PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS POR CEPAS NATIVAS DE *Chlorella Pyrenoidosa* Y *Rhodotorula Mucilaginosa* Y GENERACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO." <http://eprints.uanl.mx/3177/1/1080256488.pdf>.
- Merino Moya, Juan, and Eleuterio Lucio Encomendero Yépez. 2012. "Producción de Microalgas Usando Subproductos Mariculturales." *Pueblo cont* 23(2).
- Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial. 2010. *Política Nacional Para La Gestión Integral Del Recurso Hídrico*. <http://faolex.fao.org/docs/pdf/col146504.pdf>.
- Ministerio de Minas y Energía, Unidad De Planeación Minero Energética;, and Meteorología Y Estudio Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial Instituto de hidrología. 2005. Atlas de Radiación Solar de Colombia *Mapas de Brillo Solar*.
- Moheimani, Navid R., Mark P. McHenry, Karne de Boer, and Parisa A. Bahri. 2015. *Biomass and Biofuels from Microalgae - Volume 2*.
- Molina-Alvarado<sup>1</sup>, Andrea, and Fabio Granados-Chinchilla. 2015. "INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS ALIMENTOS PARA ANIMALES EN COSTA RICA." *Nutrición Animal Tropical* 9 (Suplemento I) 9(Suplemento I): 13–31.
- Molina-Grima, Emilio. et al. 1994. "A Mathematical-Model-of-Microalgal-Growth-in-Light-Limited-Chemostat-Culture." *J. Chem. Tech. Biotechnol* 61: 167–73.
- Mooij, Tim De et al. 2017. "Effect of Photoacclimation on Microalgae Mass Culture Productivity." *Algal Research* 22: 56–67.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.007>.
- Mook, Willem Gerrit. 2002. *Isótopos Ambientales En El Ciclo Hidrológico: Principios Y Aplicaciones*. IGME.
- Morales, Ever, César Lodeiros, and Luis Miguel Bermúdez. 2002. "Produccion de Biomasa de La Microalga Marina *Chroomonas* Sp. , En Funcion Del pH, Intensidad Luminosa Y Salinidad." *Investigaciones Marinas y costeras* 31: 167–85.
- Mulumba, Nkongolo, and Ihab H Farag. 2012. "Tubular Photobioreactor for Microalgae Biodiesel." *International Journal of Engineering, Science and Technology* 4(2): 703–

9.

- Nieves, Mario et al. 2009. "PRODUCCIÓN Y CALIDAD DE *Chaetoceros Muelleri* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NUTRIENTES Y DENSIDADES DE INÓCULOS ." 30(2): 123–33.
- Nieves, Marío, Roberto Cortés, Claudia G Gutiérrez, and Maria del Rosario Pacheco. 1994. "PRODUCCIÓN DE FITOPLANCTON ABAJO COSTO. 1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE *MONORAPHIDIUM SP (CHLOROPHYCEAE)* EN UN SISTEMA ESTÁTICO EN MEDIO F Y CUATRO A BASE DE FERTILIZANTES AGRÍCOLAS." *ANALES DEL INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA* Volumen 1-: 1–153.
- OCDE. 2016. *Pesca Y Acuicultura En Colombia*.
- Olga, Autor, and Patricia Rendón. 2016. "Economía La Pesca Se Resiente En Urabá El Turismo También Se Afectará." *El Mundo*.
- Olofsson, Martin et al. 2014. "Combined Effects of Nitrogen Concentration and Seasonal Changes on the Production of Lipids in *Nannochloropsis Oculata*." *Marine drugs* 12: 1891–1910.
- Ortega-Salas, a., and H. Reyes-Bustamante. 2012. "Cultivo de Las Microalgas Dulceacuícolas *Kirchneriella Obesa*, *Scenedesmus Quadricauda* Y *Chlorococcum Infusorium* Empleando Tres Medios de Cultivo." *Avances en Investigación Agropecuaria* 16(2): 35–44.
- Ortiz-Moreno, Martha L. et al. 2010. "Evaluación Del Crecimiento de La Microalga *Chlorella Sorokiniana* En Diferentes Medios de Cultivo En Condiciones Autotróficas Y Mixotróficas." *Red de Revistas Científicas de America Latina*: 11–20.
- Pedro, José, and Cañavate Hors. 2014. "Funciones de Las Microalgas En Acuicultura." *Researchgate* (May).
- Pérez Pazos, Jazmín Vanessa, and Pablo Fernández Izquierdo. 2012. "EFECTO DE LA LONGITUD DE ONDA DE LUZ Y VARIACIÓN EN EL SUMINISTRO DE CARBONO EN LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS NEUTROS EN LA MICROALGA *Chlorella Sp.*" v *Sinposio internacional de biofábricas* 30(3): 2–5.
- Piña, Pablo et al. 2007. "CULTIVO DE CUATRO ESPECIES DE MICROALGAS CON DIFERENTES FERTILIZANTES UTILIZADOS EN ACUICULTURA." *Rev. Invest. Mar.* 28(3): 225–36.
- Pradilla, Silvia, and Alvaro Salcedo. 2013. "ESTUDIO DE LA INCIDENCIA LUMINOSA

- EN LA PRODUCCIÓN DE MICROALGAS EN UN FOTOBIORREACTOR A ESCALA LABORATORIO.” *Journal of Chemical Information and Modeling* 53: 1689–99.
- Prieto, Martha et al. 2006. “Alimento Vivo En La Larvicultura De Peces Marinos : Live Food in the Larviculture of Marines Fishes :” *Aquaculture* 11: 30–36.
- Pulz, O. 2001. “Photobioreactors: Production Systems for Phototrophic Microorganisms.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 57(3): 287–93.
- Ramírez Duque, Jose. 2017. “Viabilidad En La Producción de Biomasa Microalgal a Partir de Fotobiorreactores Solares En El Valle Del Cauca, Colombia.” *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* Volumen 8: 127–40.
- Rendón, Correa et al. 2008. “Ictiofauna de Las Areas de Manglar En Las Bahías Turbo Y El Uno , Golfo de Urabá.”
- Romero, Fernando Aguilar. 2010. “PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS RICA EN CARBOHIDRATOS ACOPLADA A LA ELIMINACIÓN FOTOSINTÉTICA DE CO<sub>2</sub>.”
- Romo, Abril. 2002. Univeridad Autonoma de Baja Califronia Sur *Manual Para El Cultivo de Microalgas*.
- Ruiz, Ana. 2011. “Puesta En Marcha de Un Cultivo de Microalgas Para La Eliminación de Nutrientes de Un Agua Residual Urbana Previamente Tratada Anaeróbicamente.” *Universidad Politécnica de Valencia*: 102.
- Sanchez-duarte, Reyna G et al. 2018. “SÍNTESIS DE LÍPIDOS DE LA MICROALGA *Nannochloropsis Oculata* PARA SU USO.” *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* (June 2017).
- Silva, N.F.P. et al. 2015. “Towards Sustainable Microalgal Biomass Production by Phycoremediation of a Synthetic Wastewater: A Kinetic Study.” *Algal Research* 11: 350–58. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926415300242>.
- Valdés, F. J., M. R. Hernández, L. Catalá, and A. Marcilla. 2012. “Estimation of CO<sub>2</sub> stripping/CO<sub>2</sub> Microalgae Consumption Ratios in a Bubble Column Photobioreactor Using the Analysis of the pH Profiles. Application to *Nannochloropsis Oculata* Microalgae Culture.” *Bioresource Technology* 119: 1–6.
- Valenzuela-Espinoza, Enrique, Fabiola Lafarga-De la Cruz, Roberto Millán-Núñez, and Filiberto Núñez-Cebrero. 2005. “Crecimiento, Consumo de Nutrientes Y Composición Proximal de *Rhodomonas Sp.* Cultivada Con Medio f/2 Y Fertilizantes

- Agrícolas.” *Ciencias Marinas* 31(1 A): 79–89.
- Velasco, Luz Adriana, Judith Barros-gómez, Gloria Helena Ospina-salazar, and Carlos Alberto Trujillo. 2006. “Efecto de La Intensiada Lumínica, Temperatura Y Salinidad Sobre El Crecimiento de La Microalga Isochrysis Galbana (CLON T-ISO).” *Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales* 5(18): 93–99.
- Verma, Ritu, Rahul Kumar, Luv Mehan, and Aradhana Srivastava. 2018. “Modified Conventional Bioreactor for Microalgae Cultivation.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 125(2): 224–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.09.003>.
- Van Wageningen, Jon et al. 2012. “Effects of Light and Temperature on Fatty Acid Production in *Nannochloropsis Salina*.” *Energies* 5(3): 731–40.
- Wahidin, Suzana, Ani Idris, Sitti Raehanah, and Muhamad Shaleh. 2013. “The Influence of Light Intensity and Photoperiod on the Growth and Lipid Content of Microalgae *Nannochloropsis Sp.*” *Bioresource Technology* 129: 7–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.032>.
- Wu, Yin-Hu, Yin Yu, and Hong-Ying Hu. 2015. “Microalgal Growth with Intracellular Phosphorus for Achieving High Biomass Growth Rate and High Lipid/triacylglycerol Content Simultaneously.” *Bioresource technology* 192: 374–81. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415007300>.