



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

Presentada para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

por

Jessica Karina Suastes Rivas  
Ingeniero Ambiental

**DISEÑO Y ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA SEMICERRADO PARA EL CULTIVO  
DE MICROALGAS**

Dirigida por

Dr. Luis Carlos Fernández Linares

México, D.F. 7 de Noviembre de 2013

### Declaración de originalidad

"Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."

Jessica Karina Suastes Rivas.



Dr. Luis Carlos Fernández Linares

Vo. Bo. del director de tesis

"Yo Jessica Karina Suastes Rivas declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."

## **CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, Distrito Federal siendo el día 07 de Noviembre del año 2013, la que suscribe JESSICA KARINA SUASTES RIVAS, alumna del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS con número de boleta A110396, adscrita a la UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la DR. LUIS CARLOS FERNÁNDEZ LINARES cede los derechos del trabajo titulado “DISEÑO Y ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA SEMICERRADO PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS” al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones de correo electrónico: lfernand36@gmail.com, jeskaksr@hotmail.com. Si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Jessica Karina Suastes Rivas

---

## Resumen

El interés por las microalgas en la generación de biodiesel se debe a la rápida generación de biomasa y alto contenido de lípidos en su estructura. El cultivo de microalgas se puede llevar a cabo en sistemas cerrados o abiertos denominados fotobiorreactores (FBR) y Raceways, respectivamente. Los sistemas cerrados permiten llevar un buen control de los parámetros y condiciones de cultivo; sin embargo, representan alto costo de inversión y operación y problemas de escalamiento. Los sistemas abiertos se han utilizado más frecuentemente para la producción de microalgas a gran escala, pero presentan problemas de baja productividad, contaminación, evaporación y deficiente difusión de gases. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del material y geometría de cubiertas de sistemas de raceways semicerrados en el crecimiento y producción de lípidos de *Chlorococcum humicola*. El crecimiento se llevó en Medio Basal de Bold (BBM) en raceways de 10 L con un volumen de operación de 8 L. Se evaluaron tres geometrías de cubierta (arco redondeado, capilla y planos asimétricos) y dos materiales, flexible tricapa y material rígido, realizando las cinéticas en exterior. Se determinó la evaporación, intensidad de luz, temperatura dentro de las cubiertas y del cultivo, biomasa, azúcares, proteínas y lípidos, así como la contaminación por cuenta en placa y microscopia. La irradiación solar recibida en los sistemas semicerrados fue hasta 50% menor a los sistemas abiertos. Un efecto significativo en la reducción de hasta el 50% de la evaporación del medio (pérdida de agua). La biomasa fue mayor en todos los sistemas con material flexible tricapa, a pesar de que la intensidad de luz recibida fue menor en comparación con el material rígido, presentándose un efecto debido al tipo de material de las cubiertas. Finalmente, No hubo un efecto significativa ( $p \geq 0.05$ ) debido a la geometría ni a los materiales de las cubiertas en el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos.

---

## Abstract

The interest in biodiesel generation from microalgae is because they have a rapid generation of biomass and high lipid content in their cell structure. Growth of microalgae can be carried out in enclosed photobioreactors or Raceway ponds. The main advantage of enclosed photobioreactors is the control of biomass growth carbon dioxide, water, nutrients, light intensity, pH and temperature. However it represents high costs of investment, operation and scaling problems. The most commercially viable method of algal production is the Raceway ponds; the advantages of raceway ponds are minimal costs needed to operate and minimal energy inputs needed to run the system. Raceway systems are easy to maintain and clean, higher cell densities and the disadvantages of Raceway ponds are low productivity, hard to control environmental conditions and as the system is so exposed it can result in the cultures being exposed to contamination.

In this present work was constructed a semiclosed raceway pond, to determine the effect of the cover material and geometry; using greenhouses overcomes the problem about evaporation, rainfall and contamination, allowing for the best productivity of *Chlorococcum humicola*. *Chlorococcum humicola* were cultured in Bold 's Basal Medium raceway ponds of 10 L containing 7 L of culture medium, which were evaluated three covers (even span, arch and uneven span) and two different materials (rigid and tri-layer polyethylene film), biomass productivity, carbohydrates, proteins, lipid and contamination were determined, establishing that the cover had an effect on the light intensity, temperature, evaporation and pollution. The solar radiation received in semiclosed raceway pond was 50% lower than open raceway pond. The results suggest statistically significant difference on the reduction of evaporation in semiclosed raceway pond by up to 50%. Biomass was higher in all the systems with three-layer flexible material, even though the received light intensity was lower compared to the rigid material; an effect due to the material of the covers was established. Finally, no significant effect of materials and geometries in carbohydrates, proteins and lipids the content ( $p \geq 0.05$ ).....

---



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 15:00 horas del día 2 del mes de Julio del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI-IPN para examinar la tesis titulada:

**"DISEÑO Y ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA SEMICERRADO PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS"**

Presentada por el alumno:

**SUASTES**

Apellido paterno

**RIVAS**

Apellido materno

**JESSICA KARINA**

Nombre(s)

Con registro: 

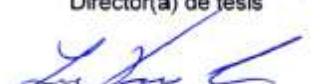
A	1	1	0	3	9	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: **Maestro en Ciencias en Bioprocenos**

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Director(a) de tesis

  
DR. LUIS CARLOS FERNÁNDEZ LINARES

  
DR. JESÚS AGUSTÍN BADILLO CORONA

  
M. en C. CARLOS OROZCO ÁLVAREZ

  
DR. LUIS GILBERTO TORRES BUSTILLOS

  
DR. JUAN SILVESTRE ARANDA BARRADAS

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE INGENIERÍA Y PROFESIONES  
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
M. en C. YESICA MARIA DOMÍNGUEZ GALICIA

EL TRABAJO EXPERIMENTAL SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DE BIOPROCESOS DEL DEPARTAMENTO DE BIOPROCESOS DE LA UNIDAD INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA (UPIBI). DEL I.P.N.

ESTE TRABAJO FUE LLEVADO A CABO CON UNA BECA DE MAESTRÍA PROPORCIONADA POR CONACYT, CON NÚMERO DE REGISTRO 392488 A QUIEN EL AUTOR AGRADECE.

Vo. Bo. Dr. Luis Carlos Fernández Linares

---

## Contenido

1. Introducción .....	5
2. Antecedentes.....	6
2.1. Los combustibles fósiles y su impacto ambiental .....	6
2.2. Energías renovables.....	7
2.3. Biocombustibles .....	10
2.3.1. Producción de biodiesel.....	15
2.4. Biodiesel a partir de microalgas.....	18
2.5. Factores que influyen en la productividad de lípidos.....	22
2.6. Sistemas de cultivo.....	23
3. Hipótesis.....	32
4. Objetivos .....	32
General.....	32
Específicos.....	32
5. Metodología.....	33
5.1. Selección de la cepa.....	34
5.1.1. <i>Medios de cultivo</i> .....	35
5.2. Determinación de la velocidad de crecimiento y contaminación.....	35
5.3. Efecto de las cubiertas de raceways de 10 L.....	36
5.3.1. <i>Selección de material y geometría de cubierta</i> .....	36
5.3.2. <i>Características principales de los raceways</i> .....	38
5.3.3. <i>Operación y monitoreo de raceways semicerrados</i> .....	39
5.4. Análisis estadístico .....	43
5.5. Métodos analíticos.....	44
5.5.1. <i>Crecimiento microalgal</i> .....	44
5.5.2. <i>Cuenta directa</i> .....	44

---

5.5.3.	<i>Densidad óptica</i> .....	44
5.5.4.	<i>Peso seco</i> .....	44
5.5.5.	<i>Contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas</i> .....	45
5.5.5.1.	<i>Extracción y determinación del contenido lipídico</i> .....	45
5.5.5.2.	<i>Determinación del contenido carbohidratos y proteínas.</i> .....	46
5.5.5.3.	<i>Contaminación por otras especies de microalgas y bacterias</i> .....	47
6.	<i>Resultados y discusión</i> .....	49
6.1.	<i>Selección de la cepa</i> .....	49
6.2.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en el cultivo de Chlorococcum humicola</i> .....	50
6.2.1.	<i>Sistemas semicerrados con material flexible 1</i> .....	51
6.2.1.1.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar, temperatura en el interior de las cubiertas y del cultivo</i> .....	51
6.2.1.2.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la pérdida de agua por evaporación</i> .....	54
6.2.1.3.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la cantidad de biomasa</i> .....	55
6.2.1.4.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos</i> .....	58
6.2.1.5.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la contaminación de los sistemas</i> .....	60
6.2.2.	<i>Sistemas semicerrados con material flexible 2</i> .....	62
6.2.2.1.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar, temperatura en el interior de las cubiertas y del cultivo</i> .....	62
6.2.2.2.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la pérdida de agua por evaporación</i> .....	63
6.2.2.3.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías en el rendimiento de biomasa</i> .....	64
6.2.2.4.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos</i> .....	67

---

6.2.2.5.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la contaminación de los sistemas</i> .....	69
6.2.3.	Sistemas semicerrados con material rígido .....	70
6.2.3.1.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar, temperatura en el interior de las cubiertas y del cultivo</i> .....	70
6.2.3.2.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la pérdida de agua por evaporación</i> .....	72
6.2.3.3.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la producción de biomasa</i> .....	73
6.2.3.4.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la cantidad de carbohidratos, proteínas y lípidos</i> .....	75
6.2.3.5.	<i>Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la contaminación de los sistemas</i> .....	77
6.3.	Efecto del material de cubierta.....	78
6.3.1.	<i>Efecto del material de cubierta en la irradiación solar y temperatura en el interior de las cubiertas</i> .....	78
6.3.2.	<i>Efecto del material de cubierta en la pérdida de cultivo por evaporación</i> ....	80
6.3.3.	<i>Efecto del material de cubierta en el rendimiento de biomasa</i> .....	81
6.3.4.	<i>Efecto del material de cubierta en el contenido de carbohidratos proteínas y lípidos</i> .....	82
6.3.5.	<i>Efecto del material de cubierta en la contaminación de los sistemas</i> .....	82
7.	Conclusiones .....	82
8.	Referencias .....	84

---

## Índice de figuras

Figura 1. Producción mundial de aceite vegetal (barras) y aporte porcentaje principales aceite vegetales: palma (□), soya (Δ), colza (◇), girasol (○) (Serraro, 2012).....	17
Figura 2. Evolución de producción mundial de biodiesel (línea) y porcentaje de aceite empleado en la producción de biodiesel (barras) (Serraro, 2012).....	17
Figura 3. Esquema fotobiorreactor tubular. ....	24
Figura 4. Representación de fotobiorreactores tubulares tipo serpentín (izquierda) y cónicos (derecha). ....	24
Figura 5. Representación de columna de burbujeo (izquierda) y airlift (derecha). ....	25
Figura 6. Esquema fotobiorreactor panel plano.....	26
Figura 7. Esquema estanque abierto Raceway.....	27
Figura 8. Raceway semicerrado (Green Star Products Complete Algae Demonstration Report).....	31
Figura 9. Estrategia experimental. ....	33
Figura 10. Fotobiorreactores para la preparación del inóculo.....	34
Figura 11. Esquema de las geometrías de cubierta. ....	36
Figura 12. Dimensiones de los raceways de 10 L. ....	38
Figura 13. Raceways semicerrados de 10 L. ....	39
Figura 14. Diagrama de flujo del software integrado dentro del microcontrolador. ....	41
Figura 15. Componentes del dispositivo electrónico instalado en los raceway de 10 L. ....	42
Figura 16. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar (↔), temperatura en el interior de la cubierta (■), temperatura del cultivo (■), y las geometrías de cubierta: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y sistema abierto (control) (D).....	53
Figura 17. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la pérdida total de agua por evaporación durante el cultivo de <i>Chlorococcum humicola</i> . ....	55
Figura 18. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la concentración de biomasa (↔), número de células (■) de <i>Chlorococcum humicola</i> y las geometrías evaluadas: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y el control (D). ....	56
Figura 19. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la cantidad biomasa al final del cultivo de <i>Chlorococcum humicola</i> .....	57
Figura 20. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubierta en el contenido de carbohidratos (■), proteínas (■) y lípidos (■) de <i>Chlorococcum humicola</i> . ....	59

Figura 21. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la contaminación del cultivo de <i>Chlorococcum humicola</i> . .....	61
Figura 22. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar (☛), temperatura en el interior de la cubierta (■), temperatura del cultivo (■), y las geometrías de cubierta: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y sistema abierto (control) (D).....	63
Figura 23. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la pérdida total de agua por evaporación durante el cultivo de <i>Chlorococcum humicola</i> . .....	64
Figura 24. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la concentración de biomasa (☛), número de células (■) y las tres geometrías de cubierta evaluadas: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y el control (D). .....	65
Figura 25. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la cantidad biomasa al final del cultivo de <i>Chlorococcum humicola</i> .....	66
Figura 26. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubierta en el contenido de carbohidratos (■), proteínas (■) y lípidos (■) de <i>Chlorococcum humicola</i> . .....	68
Figura 27. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la contaminación del cultivo de <i>Chlorococcum humicola</i> . .....	70
Figura 28. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar (☛), temperatura en el interior de la cubierta (■), temperatura del cultivo (■), y las geometrías de cubierta: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y sistema abierto (control) (D).....	71
Figura 29. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la pérdida de agua por evaporación durante el cultivo de <i>Chlorococcum humicola</i> . .....	72
Figura 30. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la concentración de biomasa (☛), número de células (■) y las tres geometrías de cubierta evaluadas: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y el control (D). .....	74
Figura 31. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la cantidad biomasa al final del cultivo de <i>Chlorococcum humicola</i> .....	74
Figura 32. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubierta en el contenido de carbohidratos (■), proteínas (■) y lípidos (■) de <i>Chlorococcum humicola</i> . .....	76
Figura 33 Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la contaminación del cultivo de <i>Chlorococcum humicola</i> . .....	77
Figura 34. Efecto del tipo de material y las geometrías de cubierta en la irradiación solar, (☛); temperatura en el interior de la cubierta, (■) y temperatura del cultivo, (■),	

planos asimétricos, (A); capilla, (B); arco redondeado, (C) y sistema abierto (control), (D). .....	79
Figura 35. Efecto del material de cubierta, en la pérdida de agua por evaporación durante el cultivo de <i>Chlorococcum humicola</i> . Material rígido (izquierda) y material flexible (derecha). .....	80
Figura 36. Efecto del tipo de material en el peso seco (  ) y el número de algas/mL (  ), y las tres geometrías de cubierta evaluadas: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y el control (D), al final de la cinética de <i>Chlorococcum humicola</i> . .....	81

## Índice de tablas

Tabla 1. Rendimiento de materias primas para producción de biodiesel (Chisti, 2007)....	20
Tabla 2. Contenido de lípidos y productividades de diferentes microalgas (Mata, 2010)..	21
Tabla 3. Principales características de fotobiorreactores y raceway (Demirbas et al., 2010). .....	28
Tabla 4. Características del material flexible seleccionado (Adaptado de la ficha técnica de Agrotecamac). .....	37
Tabla 5. Características del material rígido seleccionado (Adaptado de Agricultural plastics and meshes). .....	37
Tabla 6. Parámetros cinéticos.....	50
Tabla 7. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en el crecimiento de <i>Chlorococcum humicola</i> .....	57
Tabla 8. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en el crecimiento de <i>Chlorococcum humicola</i> .....	66
Tabla 9. Productividad de biomasa obtenida en otros estudios.....	67
Tabla 10. Comparación de la productividad lipídica obtenida en otros estudios.....	69
Tabla 11. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en el crecimiento de <i>Chlorococcum humicola</i> .....	75

## 1. Introducción

En la actualidad, las tendencias en el consumo de energía, el incremento en los precios de productos derivados del petróleo y la contaminación al ambiente producida por la combustión de éstos, han favorecido el desarrollo y uso de las energías renovables tales como la energía eólica, solar, hidráulica, mareomotriz, geotérmica y bioenergías, estas últimas provenientes de la biomasa.

La biomasa se produce a partir de materiales orgánicos como plantas, desechos de jardinería, residuos urbanos, agrícolas e industriales, plantas acuáticas y microalgas. Puede ser aprovechada para generación de calor, electricidad o para transformarla en biocombustibles, siendo una alternativa al uso de la energía convencional.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos oxigénicos, las cuales pueden crecer en ambientes muy diversos como aguas marinas, dulces, salobres, saladas y residuales. Recientemente las microalgas han atraído la atención de los investigadores por su uso potencial como fuente de materia prima para la producción de biocombustibles como biodiesel, bioetanol, hidrógeno y metano. El interés por las microalgas en la generación de bioenergía es porque tienen una rápida generación de biomasa y alto contenido de lípidos en su estructura celular usados para la producción de biodiesel.

La ventaja de las microalgas es que no compiten con los alimentos, no requieren tierras cultivables y tampoco generan deforestación, como las plantas oleaginosas. Sin embargo, una de las limitaciones actuales es obtener biomasa de microalgas en grandes cantidades y a precios competitivos.

El cultivo de microalgas se puede llevar a cabo en sistemas cerrados o abiertos denominados fotobiorreactores (FBR) y Raceways, respectivamente. Los sistemas cerrados permiten un buen control de los parámetros y condiciones de cultivo; sin embargo, representan alto costo de inversión y operación y problemas de escalamiento. Los sistemas abiertos se han utilizado más frecuentemente para la producción de microalgas a gran escala, pero presentan problemas de baja productividad, contaminación, evaporación y deficiente difusión de gases.

En el presente trabajo el objetivo principal fue evaluar el efecto la geometría y el material de cubierta de sistemas abiertos en la productividad de biomasa, azúcares, proteínas y lípidos; estableciendo el efecto de las cubiertas en la irradiación solar, temperatura, evaporación y contaminación. Lo anterior con el fin de establecer sistemas semicerrados para la producción de biomasa microalgal.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Los combustibles fósiles y su impacto ambiental

Los combustibles fósiles proceden básicamente de restos vegetales y otros organismos vivos que hace millones de años fueron sepultados y sometidos bajo ciertas condiciones de presión y temperatura. En el mundo principalmente se consumen, como fuente primaria de energía, tres tipos de combustibles de origen fósil: petróleo, carbón y gas natural.

En la actualidad, el 88% de toda la energía primaria producida a nivel mundial proviene de la quema de estos combustibles, para el 2011 el consumo creció un 2.5%. En el caso específico del petróleo, la producción anual global incrementó 1.1 millón de barriles por día (b/d) y su consumo fue de 0.6 millones de b/d, debido a esto se espera que crezca la demanda entre los años 2002 y 2030 (BP Statistical Review of World Energy, 2012). Por lo tanto, se contempla que cada vez la demanda de energía será mayor, así como el agotamiento de combustibles fósiles.

En el caso del gas natural, el consumo a nivel mundial creció un 2.2%, siendo los principales consumidores China, Arabia Saudita y Japón. La producción mundial creció un 3.1%. Siendo los EE. UU con un 7.7%, el mayor productor (BP Statistical Review of World Energy, 2012).

Los combustibles fósiles, además de ser no renovables, generan contaminación ambiental. Su combustión genera gases de efecto invernadero como lo son el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), los óxidos de azufre ( $\text{SO}_x$ ), los óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ) y partículas en la atmósfera, lo cual está directamente asociado con el calentamiento global. Estos contaminantes primarios también producen efectos secundarios como la lluvia ácida, contribuyendo a la contaminación del agua y del suelo. Asimismo, el desecho de aceites quemados o derrames de hidrocarburos producen polución en el suelo, aguas superficiales y subterráneas.

Por lo tanto, una alternativa para disminuir los impactos al medio ambiente producidos por el uso de combustibles fósiles, es generar estrategias globales enfocadas a tener seguridad energética, con un suministro estable y sostenible de energía, tener una mejora en la eficiencia energética (es decir, disminuir el uso de energía por unidad de producto, proceso o servicio), incrementar el desarrollo de tecnología y aplicar el uso de energías renovables.

## **2.2. Energías renovables**

Las fuentes renovables de energía son aquellas que posibilitan una explotación ilimitada de los recursos, en virtud de que su cantidad no se reduce a medida que ésta se aprovecha (Ramirez & Torres, 2006). Entre las opciones para reducir la dependencia del petróleo como principal energético, se considera el aprovechamiento de las energías renovables, las cuales se clasifican en: eólica, solar, hidráulica, mareomotriz, geotérmica y biomasa.

La energía eólica hace referencia a aquellas tecnologías y aplicaciones en las cuales se obtiene la energía cinética generada por efecto de las corrientes del aire, transformándola en otra fuente de energía como la eléctrica o la mecánica. Se pueden distinguir dos tipos de aplicaciones: (1) para la producción de electricidad y (2) las de bombeo de agua. Utilizando principalmente, dos tipos de máquinas que aprovechan la energía contenida del viento: los aerogeneradores, siendo los parques eólicos las instalaciones más comunes para la producción de electricidad y los molinos, que se utilizan fundamentalmente para bombeo mecánico del agua. La generación de energía eólica en el año 2011 aumentó un 20.5%, incrementando de 40.6 a 239 GW. La tasa de crecimiento para los últimos 10 años es de poco más del 25% anual, lo que implica una duplicación de la capacidad cada tres años (BP Statistical Review of World Energy 2012).

La energía eólica genera hasta ahora 437 TWh de electricidad, alrededor del 2% de la generación total de electricidad (BP Statistical Review of World Energy 2012). Presenta ventajas importantes ya que no produce emisiones de gases de

efecto invernadero y no está sujeta a la volatilidad de los precios de los combustibles. Sin embargo, depende críticamente de la velocidad del viento, produce contaminación visual y auditiva, además de generar un impacto en la fauna que habita las zonas de viento, debido a que utilizan el recurso como una guía en sus migraciones anuales.

La energía solar se ha desarrollado en dos direcciones: conversión fotovoltaica y conversión térmica, caracterizados por la tecnología que se utiliza para captar la energía solar directa y convertirla en una forma eficiente de energía. La energía solar fotovoltaica se basa en la utilización de celdas, conductores o módulos fotovoltaicos, fabricados con materiales semiconductores cristalinos, los cuales son excitados cuando se incide radiación solar sobre éstos, provocando saltos electrónicos para generar corriente eléctrica (SENER, 2006).

La energía térmica consiste en la absorción de la energía solar y la transformación de calor de forma pasiva o activa. Consiste en paneles planos, captan la energía solar en base a la intensidad e incidencia del sol. La generación de energía solar en el año 2011 aumento un 73.3%, incrementando de 29.3 GW a 63.4 GW. Su capacidad ha crecido casi diez veces en los últimos 10 años (BP Statistical Review of World Energy, 2012). La principal desventaja que presenta este tipo de energía, es el impacto visual negativo y la contaminación que se genera con las baterías de desecho que se producen.

La energía hidráulica es producida, utilizando la energía cinética del movimiento de masas de agua, o la energía potencial del agua disponible a una cierta altura. Este proceso permite la transformación de dicha energía en electricidad, utilizando turbinas hidráulicas que mediante el volumen de agua que circula a través de éstas, producen el movimiento de giro necesario para generar energía eléctrica. Para transformar la potencia mecánica de rotación de la turbina en energía eléctrica se utilizan generadores eléctricos. La energía hidráulica constituye una tecnología muy conocida, sin embargo, uno de los inconvenientes es el alto costo

de inversión que implica el desarrollo inicial del proyecto además de que el proceso de construcción puede causar alteraciones al ambiente (SENER, 2006).

La energía geotérmica se obtiene a partir del calor contenido en los materiales que componen el núcleo y el manto de la Tierra, transformándolo en energía eléctrica o utilizando el calor para uso humano (SENER, 2006).

Este proceso se lleva a cabo explotando los yacimientos geotérmicos, requiriendo de un cierto número de pozos de producción. De esta manera, la generación de electricidad por medio de la energía geotérmica y, por lo tanto, la estimación del potencial aprovechable están íntimamente ligadas con las condiciones naturales del yacimiento geotérmico utilizado para ese fin. La generación de energía geotérmica en el año 2011 aumento solo un 0.8% (88MW), para llegar a 11 GW (BP Statistical Review of World Energy, 2012).

Sobre la participación de estas energías renovables en México para el año 2012, se debe mencionar que se contó con 14,324 MW de capacidad instalada de generación eléctrica basada principalmente en grandes hidroeléctricas, lo que representó el 22.3% de la capacidad total de generación eléctrica en el país. Se estima un potencial eólico de 71,000 MW, un potencial hidroeléctrico de 53,000 MW, y más de 40,000 MW de potencial geotérmico para usos eléctricos y térmicos (ProMéxico, 2012).

También se debe resaltar el aporte de la biomasa para la generación de bioenergías. La energía de la biomasa consiste en emplear la materia orgánica, principalmente la formada en el proceso de fotosíntesis (plantas), en el cual la energía solar es utilizada, para convertir los compuestos inorgánicos (como el CO<sub>2</sub>) en compuestos orgánicos (SENER, 2006).

La energía de la biomasa se puede derivar de:

- Productos agrícolas como la caña de azúcar, el maíz, la soya, el sorgo, la cebada, el trigo y la yuca.
- Productos orgánicos no comestibles como lo son la palma africana, la higuera, la jatropha curca, la colza, la celulosa, la paja, el carbón vegetal, y la remolacha.
- Residuos orgánicos que pueden ser desechos de jardinería y desechos del sector agrícola como la cáscara de arroz, la cáscara de nueces, el bagazo, y la madera así mismo sustancias de origen animal (grasas, restos, excremento, etc.).
- Residuos municipales como los desechos de papel.
- Lodos generados básicamente en el tratamiento de aguas negras.
- Otros organismos como las microalgas.

La biomasa es una fuente de energía limpia y potencialmente renovable además de que ha recibido considerable atención para ser utilizada como materia prima para la producción de biocombustibles.

### **2.3. Biocombustibles**

Los biocombustibles son fuentes de energía limpia y renovable, además han recibido considerable atención ya que son obtenidos del procesamiento de la biomasa. Con su uso se minimiza la dependencia de los combustibles fósiles y la producción de CO<sub>2</sub> ya que emiten menos CO<sub>2</sub> en el proceso de combustión, por ser el mismo que se libera durante el proceso de fotosíntesis, por lo cual no existe un aumento del CO<sub>2</sub> total en la atmósfera (Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2009).

Los biocombustibles se pueden clasificar en: sólidos, gaseosos y líquidos. Los tres tipos principales de biocombustibles, utilizados a nivel comercial son el biogás, biodiesel (bio-ésteres) y bioetanol (Naik *et al.*, 2009). Los cuales pueden ser producidos, a partir de la materia prima, por procesos termoquímicos y/o biológicos.

Los biocombustibles sólidos son la biomasa sin procesar y residuos municipales orgánicos, los cuales simplemente son utilizados para producir energía calorífica y electricidad, a través de procesos como la combustión directa, licuefacción, pirólisis y gasificación (Naik *et al.*, 2009).

La combustión es el proceso conocido como la quema directa de la materia orgánica, la cual se transforma con un aporte de energía y que en presencia de oxígeno, da lugar a formación de nuevas sustancias y a la liberación de energía en forma de calor y luz. Los productos son: dióxido de carbono y agua con la liberación de calor. Esto implica que la combustión de biomasa posee una producción de CO<sub>2</sub> neutra (Naik *et al.*, 2009).

La licuefacción es el proceso de conversión de la biomasa sólida en un líquido. La biomasa se trata en medio acuoso a temperaturas del orden de 300-400 °C y altas presiones (120-200 bar) durante 5-15 min para obtener una fase líquida con un poder calorífico muy superior al de la biomasa inicial (López *et al.*, 2007).

La pirólisis es el proceso en el cual la biomasa experimenta una descomposición térmica en ausencia de oxígeno a una temperatura de 500 °C. La pirólisis habitualmente es dividida en pirólisis lenta y pirólisis rápida (López *et al.*, 2007).

La gasificación es el proceso de conversión de la biomasa sólida en un gas. El gas se puede producir por vía catalítica y no catalítica, utilizando temperaturas de aproximadamente 750-1000 °C. Este proceso se cumple en una cámara cerrada y sellada que opera por debajo de la presión atmosférica y se desarrolla en varias etapas como: secado, pirólisis, oxidación y reducción (López *et al.*, 2007).

Los biocombustibles gaseosos son el biogás o biometano y el hidrógeno. El biogás está conformado por una mezcla de gases: 60-70% de metano, y 30% de dióxido de carbono; se produce de manera natural en pantanos o fosas y de manera artificial a través de biodigestores, por medio de bacterias anaeróbicas, ausencia de oxígeno y a través de la digestión anaerobia de la materia o desechos orgánicos.

El proceso de la digestión anaerobia, es un proceso complejo que consiste en 3 etapas:

**Hidrólisis:** La materia orgánica es metabolizada por los microorganismos, que descomponen las cadenas largas de materia orgánica en otras más cortas, obteniéndose los productos intermedios.

**Acidogénesis:** En esta fase se convierten los productos intermedios en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono. Estas dos fases las llevan a cabo un primer grupo de bacterias, las hidrolíticas-acidogénicas y las acetogénicas que hidrolizan y fermentan las cadenas complejas de la materia orgánica en ácidos orgánicos simples (en su mayoría, ácido acético), produciendo oxígeno, el cual es consumido por bacterias anaerobias facultativas, consumiéndose de esta manera el oxígeno, generando el ambiente anaerobio.

**Metanogénesis:** En esta etapa, el segundo grupo de bacterias convierte los ácidos orgánicos en metano y dióxido de carbono. Denominadas bacterias metanogénicas, las cuales transforman los ácidos propiónico y acético, Mientras que otro grupo de bacterias, las hidrogenófilas, consumen el hidrógeno generado en la primera parte de la reacción y lo convierten en biogás. Estas últimas bacterias son fundamentales para el equilibrio de las condiciones ambientales de la reacción, puesto que una acumulación de hidrógeno alteraría la biodigestión de la materia orgánica. Con la digestión anaerobia de la biomasa, ésta debe presentar una relación C: N apropiada, para tener un buen desarrollo del proceso.

El hidrógeno se produce por la hidrólisis de la materia orgánica por medio de bacterias anaerobias y bacterias fermentativas con la intervención de dos tipos de enzimas: hidrogenasas y nitrogenasas, a través de procesos biológicos como: foto-fermentaciones y fermentaciones en la oscuridad. Otro ejemplo es la generación de hidrógeno por biofotólisis (también llamada fotodisociación biológica del agua), realizada por microalgas fotoautótrofas. Ésta se refiere a la conversión de agua y energía solar (utilizada) a hidrógeno y oxígeno. Por ejemplo, la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, es capaz de producir hidrógeno gaseoso en lugar de oxígeno molecular mediante la fotosíntesis cuando hay deficiencia de azufre (Ruiz, 2011).

Y por último, se ha planteado la producción de biodiesel, el cual puede ser producido por conversión termoquímica, a través de la pirólisis de la biomasa (Demirbas, 2008).

Debido a que los procesos de transformación de la biomasa antes mencionados pueden ser menos rentables para un proceso a gran escala en la producción de biocombustibles. Se está impulsando más la investigación para la producción de biocombustibles líquidos (biocarburantes, o agrocombustibles), principalmente para suplir los combustibles como el diesel y la gasolina y debido a la creciente necesidad de buscar fuentes alternativas al petróleo y carbón, sin olvidar la seguridad energética y aspectos socioeconómicos relacionados con el sector alimentario.

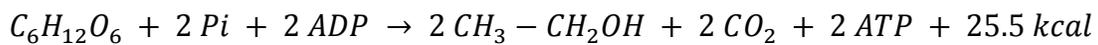
Los principales tipos de biocombustibles líquidos, son el bioetanol y el biodiesel. El bioetanol, también llamado etanol de biomasa. Se produce a partir de la fermentación, de cualquier material que contenga azúcar, almidón y celulosa, por medio de microorganismos como levaduras (*Saccharomyces*), bacterias (*Zymomonas*) y el moho (micelio), que convierten el sustrato directamente en etanol y CO<sub>2</sub> (Naik *et al.*, 2009).

La conversión de la biomasa a etanol requiere un número de operaciones unitarias básicas como:

**Pretatramiento de la muestra:** En esta parte del proceso la materia prima se recolecta, se limpia, se tritura o se muele, para poderla llevar al paso siguiente.

**Producción enzimática:** Es el proceso de transformación del almidón o celulosa en azúcares fermentables, lo cual involucra una hidrólisis, por medio de un proceso enzimático y/o químico a través de una hidrólisis ácida.

**Fermentación:** La fermentación (a) aeróbica o (b) anaeróbica en presencia y ausencia de oxígeno, respectivamente. Puede describirse como una glicólisis, de tal forma que puede verse cómo participa inicialmente una molécula de hexosa:



La vía metabólica de producción de etanol se conoce como vía *Embden-Meyerhof-Parnas*, en la cual a partir de una molécula de glucosa se producen dos moléculas de etanol.

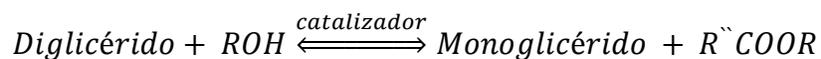
**Recuperación del etanol:** La destilación es el proceso de separación, de los diferentes componentes líquidos de una mezcla (etanol/agua), por medio de calor. Sin embargo, las condiciones de la destilación dependerán de la eficiencia de la fermentación, para poder separar una mezcla etanol/agua. El número de pasos del proceso dependerá de la materia prima así como de la calidad de la misma (Budny, 2007). De acuerdo a la materia prima para la producción de etanol se requerirán mayor o menor número de pasos en el proceso. Así mismo, para tener un buen desarrollo del proceso es deseable que la biomasa contenga alto contenido de carbohidratos (Ruiz, 2011).

### 2.3.1. Producción de biodiesel

El biodiesel es un sustituto del diesel y se fabrica a partir de aceites vegetales sin usar o gastados, así como de grasas animales y microalgas (Demirbas, 2008). Desde el punto de vista químico estas materias primas contienen ácidos grasos, los cuales se someten a un proceso de transesterificación.

La interesterificación o transesterificación, es la reacción de un triglicérido con un alcohol. La síntesis de biodiesel consiste en el desplazamiento de la glicerina del triglicérido y la substitución de la misma por un radical alquílico proveniente de un alcohol, obteniéndose un éster del alcohol empleado y glicerol. Los productos de la reacción es una mezcla de ésteres mono alquílicos (biodiesel) y glicerol, que es un co-producto utilizado en la producción de químicos de alto valor añadido.

Este proceso ocurre en tres pasos consecutivos, y en cada paso se forma 1 mol de biodiesel, así (Marchetti, 2007):



$\text{R}^{\prime}$ ,  $\text{R}^{\prime\prime}$  y  $\text{R}^{\prime\prime\prime}$  son hidrocarburos de cadena larga. Por lo tanto, de 1 mol de triglicérido y 3 moles de alcohol, se produce 1 mol de glicerina y 3 moles de alquiléster (biodiesel).

La alcoholisis se puede realizar por catálisis básica, ácida, ácido/básica, enzimática o alcohol supercrítico. La selección del catalizador depende de la cantidad de ácidos grasos libres (AGL) presentes en el aceite. En la catálisis básica el catalizador es generalmente NaOH o KOH, mientras que en la catálisis ácida es HCl o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Rojas, Girón, & Torres, 2009).

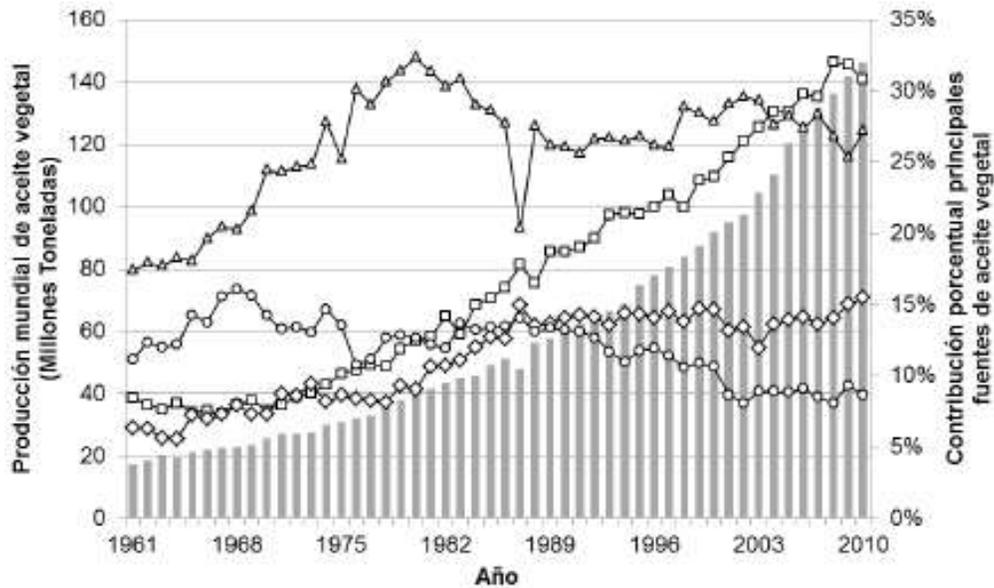
### **2.3.1.1. Materia prima para la producción de biodiesel**

Los principales sustratos empleados para producir biodiesel son aceites vegetales o animales. La constitución básica de los aceites vegetales es de 90-98% triglicéridos y una pequeña cantidad de mono y diglicéridos; los cuales contienen usualmente ácidos grasos libres, agua, esteroides, fosfolípidos, odorantes y otras impurezas (Srivastava *et al.*, 2000).

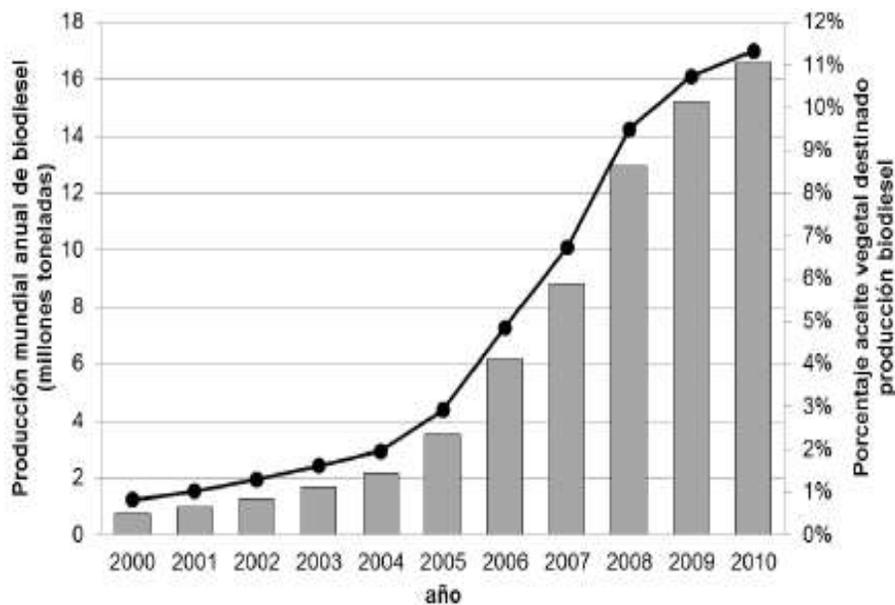
Las ventajas de los aceites vegetales como fuente para biodiesel son su portabilidad, disponibilidad inmediata, bajo contenido de sulfuros y biodegradabilidad. El balance energético para producirlo puede ser positivo (es decir, la cantidad de energía necesaria para producir el biocombustible es menor a la energía que se libera cuando se lleva a cabo la combustión). Además, la producción de biodiesel a partir de diferentes tipos de aceite, tiene emisiones de dióxido de carbono e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Mahapatra & Ramachandra, 2013; Ortega & Reyes, 2012), inferiores al petrodiesel.

Las principales desventajas son la alta viscosidad, baja volatilidad y la reactividad de las cadenas de hidrocarburos insaturados (Demirbas, 2008). Además se ha identificado, que el rendimiento de la reacción de transesterificación depende del tipo de aceite (contenido de ácidos grasos), contenido de agua, la temperatura de reacción, el tipo y cantidad de catalizador, la proporción y tipo de alcohol, tiempo de reacción, etc.

Actualmente, los aceites de soya, colza y palma son los principales insumos para la producción de biodiesel. La oferta mundial de aceites vegetales, y sus cuatro principales fuentes, es de una producción total aproximada de 146 millones de toneladas para el año 2010 (figura 1), de las cuales el 11,3% fueron destinadas para la producción de biodiesel (figura 2), correspondientes a 16,6 millones de toneladas (Serrano, 2012).



**Figura 1.** Producción mundial de aceite vegetal (barras) y aporte porcentaje principales aceite vegetales: palma (□), soya (Δ), colza (◇), girasol (○) (Serraro, 2012).



**Figura 2.** Evolución de producción mundial de biodiesel (línea) y porcentaje de aceite empleado en la producción de biodiesel (barras) (Serraro, 2012).

La producción de biodiesel a partir de cultivos vegetales se ha visto cuestionada, principalmente por la gran demanda de superficies que pueden ser utilizadas para la producción de alimentos, la competencia con los cultivos alimentarios, el abastecimiento de materias primas y el impacto que puede tener sobre la biodiversidad. Esto ha generado efectos negativos, ya que ha habido aumento en los precios de los alimentos para los consumidores, incremento en la deforestación y reducción de la biodiversidad.

Una alternativa a los cultivos, es el empleo de aceites gastados de cocina, ya que están disponibles a un precio relativamente barato. Sin embargo esta alternativa presenta una gran cantidad de componentes indeseables como ácidos grasos libres y agua (Demirbas, 2008).

Otro ejemplo de fuente potencial para la producción de biodiesel son las grasas de origen animal. Las principales grasas animales empleadas son sebo, grasa blanca o manteca de cerdo, grasa de aves y grasa amarilla (Demirbas, 2008). Tienen mayor contenido de ácidos grasos saturados, por lo tanto proporcionan mayor estabilidad al producto final, pero existe una cantidad disponible muy limitada, y por lo tanto es una tecnología que es incapaz de cubrir la necesidad energética en el mundo.

Por las razones antes mencionadas se ha tenido interés a nivel mundial por explotar el potencial de las microalgas para producir biodiesel a partir de la síntesis y conversión de los aceites que éstas tienen y que son de composiciones similares a los aceites vegetales.

#### **2.4. Biodiesel a partir de microalgas.**

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos procariotes y eucariotes conocidas por su rápido crecimiento y alto contenido energético. Las clases de microalgas más conocidas son: las diatomeas (*Bacillariophyceae*), las algas

verdes (*Chlorophyceae*), las cianobacterias (*Cyanophyceae*), conocidas como algas verdeazuladas y las heterokontofitas (*Heterokontophyta*) (Garibay, 2008).

Las algas procariotas o cianobacterias no presentan membrana celular ni organismos diferenciados. Las algas eucariotas se definen por la presencia de una doble membrana en el núcleo y organelos como mitocondrias y cloroplastos (Fuerst, 2010).

La estructura básica del aparato fotosintético en las microalgas son los cloroplastos, los cuales contienen una serie de vesículas llamadas tilacoides, rodeados de una matriz o estroma. Los tilacoides contienen la clorofila y son el sitio donde se llevan a cabo las reacciones fotoquímicas, mientras que la fijación del dióxido de carbono ocurre en el estroma. Los organelos están rodeados por membranas bicapa de lípidos, cuya estructura es altamente polar (Kirroliia, Bishnoi, & Singh, 2012).

Las microalgas son organismos que obtienen la energía de la luz proveniente del sol y/o luz artificial y se desarrollan a partir de materia inorgánica (dióxido de carbono) como fuente de carbono para llevar a cabo el crecimiento celular, producir lípidos, productos de almacenamiento y metabolitos (Demirbas *et al.*, 2010). El crecimiento celular se puede llevar bajo condiciones fotoheterotróficas y mixotróficas. Pero al parecer la producción fotoautótrofa, es el único método de producción de microalgas que se puede llevar a cabo a gran escala, que resulta económicamente rentable y técnicamente viable (Ruiz, 2011).

En la actualidad, se ha planteado producir biodiesel a partir de microalgas debido a que, aportan en la reducción de generación de gases de efecto invernadero (GEIs), debido a que utilizan grandes cantidades de CO<sub>2</sub> durante su cultivo (Demirbas *et al.*, 2010). Por ejemplo, para producir 1 kg de biomasa algal (peso seco) se utilizan aproximadamente 1.83 kg de CO<sub>2</sub> (Chisti, 2007). Así mismo, las microalgas presentan periodos cortos de duplicación (24 h), tienen una mayor

eficiencia fotosintética, para su cultivo utilizan superficies de terrenos infértiles y pueden ser producidas durante todo el año.

El rendimiento de aceite a partir de microalgas supera a los rendimientos de aceite obtenidos a partir de aceites de las plantas oleaginosas, tales como la palma y Jatrofa (tabla 1).

**Tabla 1.** Rendimiento de materias primas para producción de biodiesel (Chisti, 2007).

Cultivo	Rendimiento de aceite (L/ha/año)
Soya	450
Camelina	560
Girasol	955
Jatrofa	1,890
Aceite de palma	5,940
Microalgas <sup>(a)</sup>	5,870
Microalgas <sup>(b)</sup>	136,900

a) Con el 30% de lípidos en términos del peso seco de la biomasa.

b) Con el 70% de lípidos en términos del peso seco de la biomasa.

El contenido de lípidos de microalgas varía entre especies y cepas, por lo general va de 20% a 50% (peso seco) (tabla 2). Sin embargo, se puede aumentar este porcentaje, cambiando las condiciones de cultivo y otros factores que puedan influir en la productividad de lípidos (Mata, 2010).

**Tabla 2.** Contenido de lípidos y productividades de diferentes microalgas (Mata, 2010).

microalgas	Contenido de lípidos (% del peso seco de la biomasa)	Productividad de lípidos (mg / L / día)	Productividad volumétrica de biomasa (g / L / día)	Área de productividad de la biomasa (g/m <sup>2</sup> /día)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24.0–31.0	–	–	11.5–17.4
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0–75.0	–	0.02	3.0
<i>Chaetocero smuelleri</i>	33.6	21.8	0.07	–
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14.6–	17.6	0.04	–
<i>Chlorella emersonii</i>	16.4/39.8	10.3–50.0	0.036–0.041	0.91–0.97
<i>Chlorella protothecoides</i>	25.0–63.0	1214	2.00–7.70	–
<i>Chlorella sorokiniana</i>	14.6–57.8	44.7	0.23–1.47	–
<i>Chlorella vulgaris</i>	19.0–22.0	11.2–40.0	0.02–0.20	0.57–0.95
<i>Chlorella sp.</i>	5.0–58.0	42.1	0.02–2.5	1.61–16.47/25
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	10.0–48.0	–	2.90–3.64	72.5/130
<i>Chlorella</i>	2.0	18.7	–	3.50–13.90
<i>Chlorococcum sp.</i>	18.0–57.0	53.7	0.28	–
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	19.3	–	10	–
<i>Dunaliella salina</i>	20.0–51.1	116.0	0.22–0.34	1.6–3.5/20–38
<i>Dunaliella primolecta</i>	6.0–25.0	–	0.09	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	23.1	–	0.12	–
<i>Dunaliellasp.</i>	16.7–71.0	33.5	–	–
<i>Ellipsoidion sp.</i>	17.5–67.0	47.3	0.17	–
<i>Euglenagracilis</i>	27.4	–	7.70	–
<i>Haematococcu spluvialis</i>	14.0–20.0	–	0.05–0.06	10.2–36.4
<i>Isochrysis galbana</i>	25.0	–	0.32–1.60	–
<i>Isochrysis sp.</i>	7.0–40.0	–	0.08–0.17	–
<i>Monodus subterraneus</i>	7.1–33	37.8	0.19	–
<i>Monallanthus salina</i>	16.0	30.4	0.08	12
<i>Nannochloris sp.</i>	20.0–22.0	–	0.17–0.51	–
<i>Nannochloropsis oculata.</i>	20.0–56.0	60.9–76.5	0.37–0.48	–
<i>Nannochloropsis sp.</i>	22.7–29.7	84.0–142.0	0.17–1.43	1.9–5.3
<i>Neochloris oleoabundans</i>	12.0–53.0	37.6–90.0	–	–
<i>Nitzschia sp.</i>	29.0–65.0	90.0–134.0	–	8.8–21.6
<i>Oocystispusilla</i>	16.0–47.0	–	–	40.6–45.8
<i>Pavlovasalina</i>	10.5	–	–	–
<i>Pavlovalutheri</i>	30.9	49.4	0.16	–
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	35.5	40.2	0.14	2.4–21
<i>Porphyridium cruentum</i>	18.0–57.0	44.8	0.003–1.9	25
<i>Scenedesmus obliquus</i>	9.0–18.8/60.7	34.8	0.36–1.50	–
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	11.0–55.0	–	0.004–0.74	–
<i>Scenedesmus sp.</i>	1.9–18.4	35.1	0.19	–
<i>Skeletonema sp.</i>	19.6–21.1	40.8–53.9	0.03–0.26	2.43–13.52
<i>Skeletonema costatum</i>	13.3–31.8	27.3	0.09	–
<i>Spirulinaplatensis</i>	13.5–51.3	17.4	0.08	–
<i>Spirulina maxima</i>	4.0–16.6	–	0.06–4.3	1.5–14.5/24–
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	4.0–9.0	–	0.21–0.25	51
<i>Tetraselmis suecica</i>	20.6	17.4	0.08	25
<i>Tetraselmis sp.</i>	8.5–23.0	27.0–36.4	0.12–0.32	–
	12.6–14.7	43.4	0.30	19
				–

## 2.5. Factores que influyen en la productividad de lípidos

Las condiciones de estrés para las algas pueden inducir la síntesis de lípidos, tales como luz extrema, temperatura, pH del medio y condiciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Los efectos de la intensidad de luz en el cultivo de microalgas son de gran relevancia, ya que un nivel alto favorece la producción de lípidos (Mohan *et al.*, 2009). Evitando no tener expuesto el cultivo a un estado de luz saturada, ya que se produce fotoinhibición y reducción de la velocidad específica de crecimiento, al ser sometido a intensidades luminosas superiores a la óptima (Garibay, 2008).

La temperatura es otro factor ambiental al cual las microalgas reaccionan constantemente. La constitución química del alga, en especial la fracción lipídica, puede estar afectada significativamente por la temperatura. Así mismo la velocidad específica de crecimiento puede disminuir y haber efectos secundarios sobre los mecanismos de regulación. Los factores tales como la luz, la temperatura y el pH, pueden disminuir el riesgo de contaminación y mejorar el rendimiento (Reza, 2005).

El mezclado igualmente es esencial para el crecimiento y la productividad de lípidos, ya que homogeniza la distribución de la célula, los metabolitos y facilita la transferencia de gases. Además es conveniente fomentar la circulación de microalgas, especialmente en el cultivo a gran escala, con el fin de evitar las zonas oscuras (M. J. Gupta & Chandra, 2002). Los sistemas abiertos con un mezclado adecuado muestran mayores productividades y cultivos más estables (Moheimani & Borowitzka, 2006).

La contaminación es un aspecto, que es considerado en la productividad de lípidos. Las algas no deseadas, levaduras, hongos y bacterias son los principales contaminantes biológicos. Se ha encontrado que la contaminación puede evitarse o reducirse mediante la selección de una especie de microalga que pueda ser cultivada bajo condiciones específicas. Un ejemplo de ello es tener el cultivo bajo niveles altos de salinidad como puede serlo con *Dunaliella salina*.

## 2.6. Sistemas de cultivo

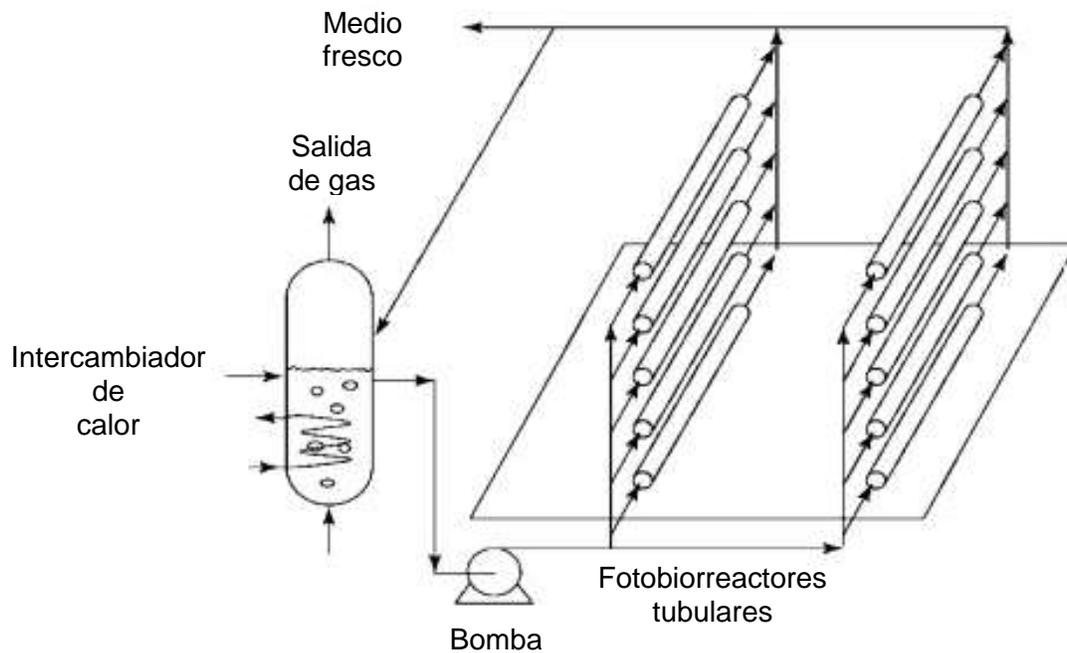
Se han utilizado diversos sistemas de cultivo de algas, prometedores en el escalamiento, debido a que se requieren grandes cantidades de biomasa para la producción de biodiesel. Estos se han clasificado principalmente en dos grupos: sistemas cerrados, también llamados fotobiorreactores (FBR) y sistemas abiertos.

Los fotobiorreactores se definen como sistemas en los que se incorpora algún tipo de luz para proporcionar energía, la cual es convertida biológicamente por microorganismos fototróficos. Prácticamente cualquier recipiente transparente se podría llamar fotobiorreactor, sin embargo dicho término es utilizado para definir un sistema cerrado. Debido a esto, el cultivo de microalgas no interactúa con el medio ambiente por lo que permiten mantener el cultivo de una sola especie de microalga por un período prolongado. Se evalúan en términos de su configuración, productividad y viabilidad económica (López *et al.*, 2010). Los fotobiorreactores se caracterizan porque se pueden controlar parámetros como pH, temperatura, concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, permitiendo tener valores más altos en la concentración celular (Serrano, 2012).

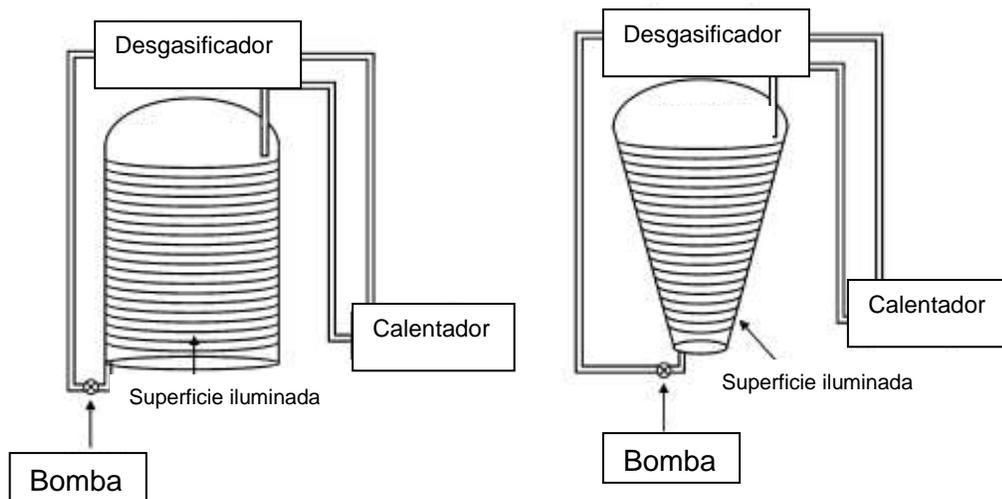
En la actualidad, hay varios diseños de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas, como lo son los tipo air-lift, planos (flatplates), tubular o de columna, estos últimos pueden estar en posición horizontal, vertical o inclinada y tipo helicoidal. Según su clasificación operacional pueden ser: aireados o mezclados con bomba.

En un fotobiorreactor tubular el cultivo es bombeado a través de un tubo largo que posteriormente es recirculado (figura 3), puede estar dispuesto horizontal o inclinado, en serpentín vertical o cónica (figura 4). Para mantener la biomasa recirculada en los FBR tubulares el sistema de aireación y mezclado se hace por lo regular mediante el bombeo del aire. Debido a esto, la transferencia de masa es alta, el mezclado es bueno y el esfuerzo de corte es bajo. Sin embargo, es difícil controlar la temperatura, el pH e inevitable controlar la aglomeración de

biomasa en las paredes, lo que resulta en un problema significativo, ya que reduce el área de exposición a la luz (Jena *et al.*, 2012)



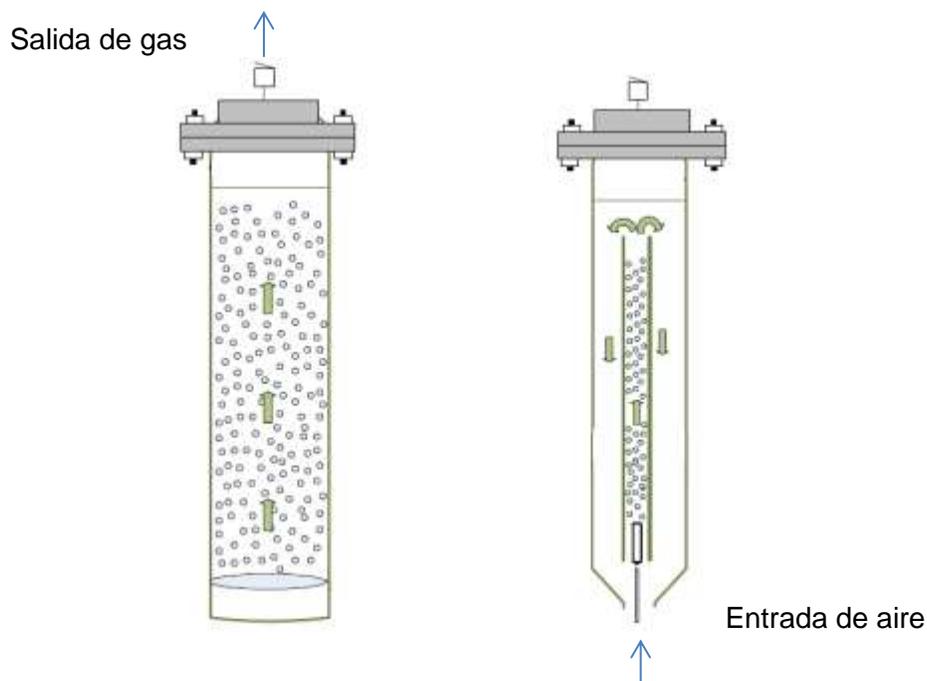
**Figura 3.** Esquema fotobiorreactor tubular.



**Figura 4.** Representación de fotobiorreactores tubulares tipo serpiente (izquierda) y cónicos (derecha).

Los fotobiorreactores de columna de burbujeo y air-lift (figura 5), están colocados verticalmente, en estos sistemas se introduce aire burbujando desde la parte inferior o superior y la fuente de iluminación puede estar instalada en las paredes o en el interior. El diámetro del FBR suele ser menor a 20 cm para permitir que la luz llegue al interior de la columna (Ruiz, 2011).

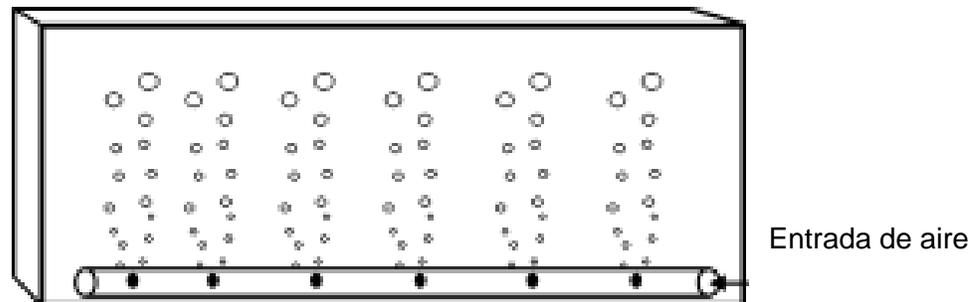
Existen reportes de que las columnas de burbujas y los reactores airlift, con diámetros menores a 0.19 m, permiten una concentración de biomasa y tasas de crecimiento que son comparables con los valores típicos de los fotobiorreactores tubulares (Toledo, 2010).



**Figura 5.** Representación de columna de burbujeo (izquierda) y airlift (derecha).

Los fotobiorreactores de paneles planos han recibido mucha atención en la actualidad debido a su gran superficie de iluminación, lograda por la trayectoria de luz tan corta dentro del reactor (figura 6).

Los materiales usados en la construcción de las placas son usualmente materiales transparentes como el PVC, para maximizar la utilización de la energía luminosa. Algunas de las ventajas es que la acumulación de O<sub>2</sub> disuelto es baja, la eficiencia fotosintética es alta, se alcanza altas productividades de biomasa, son relativamente baratos de construir y de fácil limpieza.



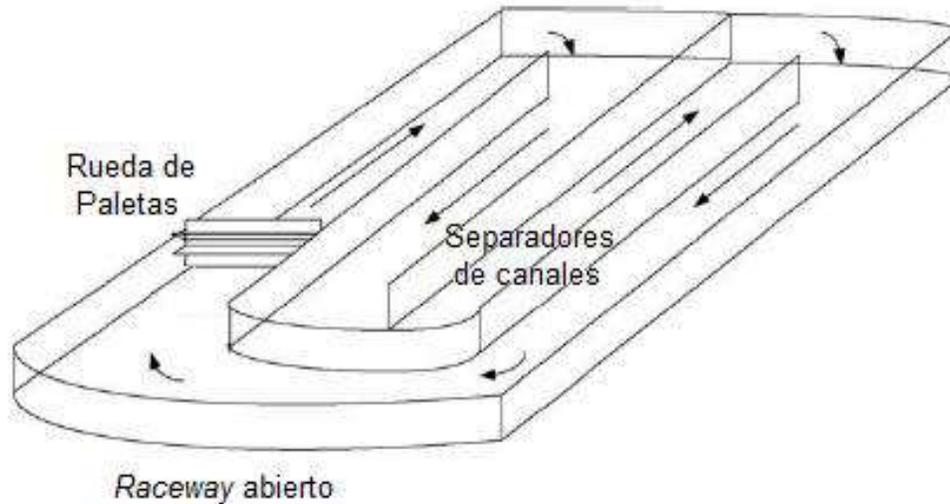
**Figura 6.** Esquema fotobiorreactor panel plano.

Los sistemas abiertos son básicamente estanques o contenedores diseñados en distintas formas, los cuales son utilizados para la producción de microalgas, en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera. Existen cuatro diseños: Estanques poco profundos, tanques, estanques circulares y estanques tipo raceway

Los estanques circulares utilizan un brazo giratorio para proporcionar la agitación y se han operado principalmente en Japón y Taiwán. Las principales desventajas de este tipo de estanques son su costosa construcción y el alto consumo energético utilizado en el mezclado (Chen *et al.*, 2006).

Los raceways están constituidos por canales en forma de circuito cerrado poco profundos entre 10 y 30 cm y de 2 a 3 m de ancho (figura 7), pueden estar contruidos debajo o por encima del suelo, están hechos principalmente con materiales como cemento, pvc, plástico y fibra de vidrio.

Para promover un adecuado mezclado en estos sistemas el medio de cultivo es impulsado mediante paletas rotatorias. La velocidad suficiente para mantener el cultivo en suspensión es de  $5 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , sin embargo, tal velocidad es difícil de mantener debido a que es muy baja, por lo que en la práctica, las velocidades de flujo son de  $20 \text{ a } 30 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  (Ketheesan *et al.*, 2010).



**Figura 7.** Esquema estanque abierto Raceway.

Los sistemas abiertos son más susceptibles a las condiciones climáticas, teniendo una variabilidad muy grande en la iluminación y en la temperatura del cultivo, la pérdida por evaporación puede ser significativa, se contaminan fácilmente con microorganismos no deseados y otras especies de algas, presentando baja productividad de biomasa. La producción de biomasa y productividad lipídica son de cerca de  $1 \text{ g/L}$  y de  $10 \text{ a } 25 \text{ g/m}^2/\text{d}$ , respectivamente (tabla 3).

**Tabla 3.** Principales características de fotobiorreactores y raceway (Demirbas et al., 2010).

Característica	Raceway	Fotobiorreactores
<i>Cultivo</i>		
Relación: Área-Volumen	Grande (4-10 veces mayor)	Pequeña
Especies de algas	Restringido	Flexible
Selección de especies	Competencia por el crecimiento	Resistencia al corte
Contaminación	Posible	Poco probable
Periodo de cultivo	Limitado	Amplio
Perdida de agua por evaporación	Posible	Prevenible
Condiciones sobre el control de crecimiento	Muy difícil	Fácil
Utilización eficiente de luz	Pobre	Excelente
Transferencia de gas	Pobre	Alta
Temperatura	Muy variable	Requiere refrigeración
Control de la temperatura	Ninguna	Excelente
Sistema automático de enfriamiento	Ninguna	Construcción
Sistema automático de calefacción	Ninguna	Construcción
Limpieza	Ninguna	Por las paredes, acumulación
Seguridad microbiológica	Ninguna	UV
Eficiencia en la cosecha	ninguna	Alta
<i>Producción de biomasa</i>		
Calidad de biomasa	Variable	Reproducibile
Productividad de biomasa	Baja	Alta
Densidad	Baja	Alta
<i>Modo de operación</i>		
Bomba de aire	Construcción	Construcción
Corte	Baja	Alta
Tasa de transferencia de CO <sub>2</sub>	Pobre	Excelente
Eficiencia en el mezclado	Pobre	Excelente
Pérdida de agua	Muy alta	Baja
Concentración de O <sub>2</sub>	Baja debida a la espontanea salida	Cambio de equipo
Pérdida de CO <sub>2</sub>	Alta	Baja
<i>Economía</i>		
Requerimiento de tierra	Alta	Baja
Capital de inversión	Pequeña	Alta
Periodo de mantenimiento	Menor	Suficiente
Costo de operación	Baja	Alta
Costo de periodo de cultivo	Alta	Baja
Costo de parámetros	Mezclado	O <sub>2</sub> , control de la temperatura.
Ampliación a nivel comercial	Fácil de escalar	Difícil en muchos fotobiorreactores.

En términos económicos, obtener biodiesel a partir de microalgas cultivadas en fotobiorreactores es menos factible, porque la energía requerida para el mezclado es más alta. Además de que son más caros de construir y operar. Sin embargo, la selección entre fotobiorreactores y raceways principalmente depende de los requerimientos específicos del cultivo y del costo de producción.

La producción comercial de biomasa microalgal se ha realizado casi exclusivamente en sistemas abiertos (Laurens & Wolfrum, 2011). Debido a que son menos caros de construir y operar, y son fáciles de escalar. Los raceways pueden tener un aumento a escala de hasta 5000 m<sup>2</sup> o incluso más (Laurens & Wolfrum, 2011). Mientras tanto, para los fotobiorreactores, el escalamiento es menor debido a que se debe de mantener una proporción entre área/volumen. El diámetro de los fotobiorreactores no debe de ser superior a 0.2 m o la disponibilidad de luz se ve reducida severamente, así mismo la altura de la columna es limitada a 4 m.

Los raceways semicerrados o en invernaderos son una opción interesante para el cultivo de microalgas. Estos sistemas o condiciones solucionan muchos problemas que poseen los sistemas abiertos: hay menor probabilidad de contaminación por otras especies o bacterias, hay un mejor control de la temperatura, menos pérdida del cultivo por evaporación y no están expuestos a la lluvia. Esto permite tener un mejor control del crecimiento de las microalgas.

La cubierta puede ser de cualquier tipo de material transparente, translucido incluyendo plástico o vidrio y de cualquier forma geométrica. La transmisión de la luz a través de una cubierta depende fundamentalmente de las características propias del material de cubierta y del ángulo de incidencia de la radiación sobre la superficie de la cubierta. En cuanto al ángulo de incidencia, este varía de acuerdo a la geometría de la cubierta.

Los materiales de cubierta se dividen en tres grupos:

- Vidrio impreso.
- Plásticos rígidos: polimetacrilato de metilo (PMM), policarbonato (PC), poliéster con fibra de vidrio, policloruro de vinilo (PVC).
- Plásticos flexibles: policloruro de vinilo (PVC), polietileno de baja densidad (López *et al.*, 2007), etileno vinilo de acetato (EVA), policloruro de vinilo (PVC) y materiales coextruidos. Estos últimos son varias películas y se combinan distintas propiedades para mejorar las prestaciones del material plástico. En el mercado destacan los plásticos bicapa y tricapa.

Los plásticos bicapa y tricapa son usados para el uso eficaz de la luz y el calentamiento térmico del sistema. Con estos materiales de cubierta la radiación solar es absorbida (incrementándose la temperatura en la superficie), otra parte es reflejada y la restante es transmitida al interior del invernadero (incrementándose la temperatura en el interior del sistema y del cultivo). De esta manera, se puede tener un mejor control de la temperatura del aire, la cual por transferencia de calor o conducción de calor regula la temperatura del cultivo y se mantiene la misma durante la noche, debido a que hay evaporación y condensación del cultivo. Estos parámetros son importantes para el cultivo a escala de microalgas, ya que el crecimiento y rendimiento de las microalgas están obviamente relacionados con la disponibilidad de luz. La temperatura del cultivo es un parámetro fisiológico, que debe de mantenerse dentro de los rangos óptimos para lograr un buen crecimiento, desarrollo y producción microalgal.

Por otro lado, se ha prestado poca atención al arreglo geométrico de las cubiertas, sin embargo son un factor importante en la maximización del uso de la energía solar.

Las geometrías de cubierta son circulares, simétricas y asimétricas. Zamir *et al.* (1983) encontraron que se podría ahorrar hasta el 15% de la radiación solar incidente con una geometría de cubierta circular y Sethi (2008) obtuvo mejores resultados de la radiación solar con cubiertas asimétricas que con simétricas.

Hasta el momento solo la compañía Green Star Products ha iniciado la construcción de una instalación con un raceway cubierto de 40.000 L de capacidad en Montana (Figura 8) y tienen como objetivo controlar la temperatura, variación en la luz, en la evaporación y la contaminación. Así como el de investigar los efectos del sistema dentro del invernadero: en las temperaturas del aire y del agua y los flujos y consumo de calor.



(a) Vista exterior



(b) Vista al interior

**Figura 8.** Raceway semicerrado (Green Star Products Complete Algae Demonstration Report).

### 3. Hipótesis

Los raceways semicerrados, reducirán las pérdidas de agua del cultivo por evaporación y la contaminación del medio.

La geometría y el material de la cubierta de los sistemas semicerrados favorecerán una mayor producción y productividad de biomasa, azúcares, proteínas y lípidos de una microalga.

### 4. Objetivos

#### General.

Establecer el efecto de la geometría y material de la cubierta en la productividad de biomasa microalgal, azúcares, proteínas y lípidos en raceways semicerrados.

#### Específicos

- Seleccionar una cepa de microalga para ser cultivada en raceways de 10 L, con perspectiva para la producción de biocombustibles.
- Evaluar la influencia de tres diferentes geometrías y dos materiales de cubierta en la irradiación solar, temperatura en el interior y del cultivo, evaporación, contaminación, productividad de biomasa, azúcares, proteínas y lípidos en raceways de 10 L.

## 5. Metodología

Para lograr los objetivos antes planteados, en el presente trabajo se desarrolló la siguiente estrategia experimental (Figura 9).



**Figura 9.** Estrategia experimental.

## 5.1. Selección de la cepa

Se compararon dos cepas *Chlorella sp.* y *Chlorococcum humicola*, a través de sus cinéticas de crecimiento para las cuales fueron crecidas en medio en medio BG-11 y BBM respectivamente, en fotobiorreactores de 2 L con un volumen de operación de 1.6 L, los cuales fueron construidos en botellas de vidrio con tapones de goma con dos puertos en tubos de vidrio (aireación y venteo) (Figura 10).

Los FBR se inocularon al 20% (v/v) con un preinóculo crecido en FBR de 100 mL y las condiciones de operación fueron las siguientes: 1 vvm de aireación y fotoperiodo de 12:12 con luz blanca de 100  $\mu\text{mol}$  fotones/ $\text{m}^2\text{s}$ , para lo cual se emplearon lámparas fluorescentes de luz blanca de 32 W (T32).

Para la selección de la cepa con la cual se inocularon los raceways se evaluaron aspectos como crecimiento celular, productividad de biomasa y contaminación del cultivo con bacterias, protozoos o rotíferos.

Al concluir con la selección de la cepa, esta cepa se mantuvo en fotobiorreactores de 10 L operados a un volumen de 8 L, con una intensidad de luz de 100  $\mu\text{mol}$  fotones/ $\text{m}^2\text{s}$ , ciclos de 12/12 luz/obscuridad y flujo de aireación de 1 vvm. Al cabo de tres semanas de incubación, 20% del cultivo era transferido a un fotobiorreactor nuevo, el cual contenía medio fresco.



**Figura 10.** Fotobiorreactores para la preparación del inóculo.

### 5.1.1. Medios de cultivo

Medio BG11 (g L<sup>-1</sup>): NaNO<sub>3</sub>, 0.75; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*3H<sub>2</sub>O, 0.04; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.075; CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 0.036; EDTA, 0.001; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.02; Ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>), 0.006; Citrato férrico amoniacal, 0.006. El medio se complementa con 1mL/L de la solución de metales trazas, la cual contiene (g/100mL): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.286; MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O, 0.181; ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.0222; NaMoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 0.039; CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O, 0.0079; Co (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.00494.

Medio basal de Bold o BBM (g L<sup>-1</sup>): 0.250 NaNO<sub>3</sub>, 0.075 MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.025 CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 0.025 NaCl. El medio se complementa con una solución de fosfatos que contiene (g L<sup>-1</sup>): 0.07 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.175 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, con 0.0498 de FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O\*, 0.0114 de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> y 1mL/L de la solución de metales traza.

### 5.2. Determinación de la velocidad de crecimiento y contaminación

A partir de la fase exponencial de cada cepa obtenida en las cinéticas de crecimiento, la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación (T<sub>d</sub>) fueron calculados mediante las ecuaciones 1 y 2, respectivamente.

La velocidad de crecimiento basada en la densidad de la población (Miller, Tompkins County (N.Y.) Dept. of Planning, & U.S. Department of the Interior), se calculó mediante la fórmula habitual;  $\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / \Delta t$ , donde N<sub>2</sub> y N<sub>1</sub> son el número de células en los tiempos t<sub>2</sub> y t<sub>1</sub>, respectivamente. El tiempo de duplicación (T<sub>d</sub>), se obtuvo a partir de «μ».

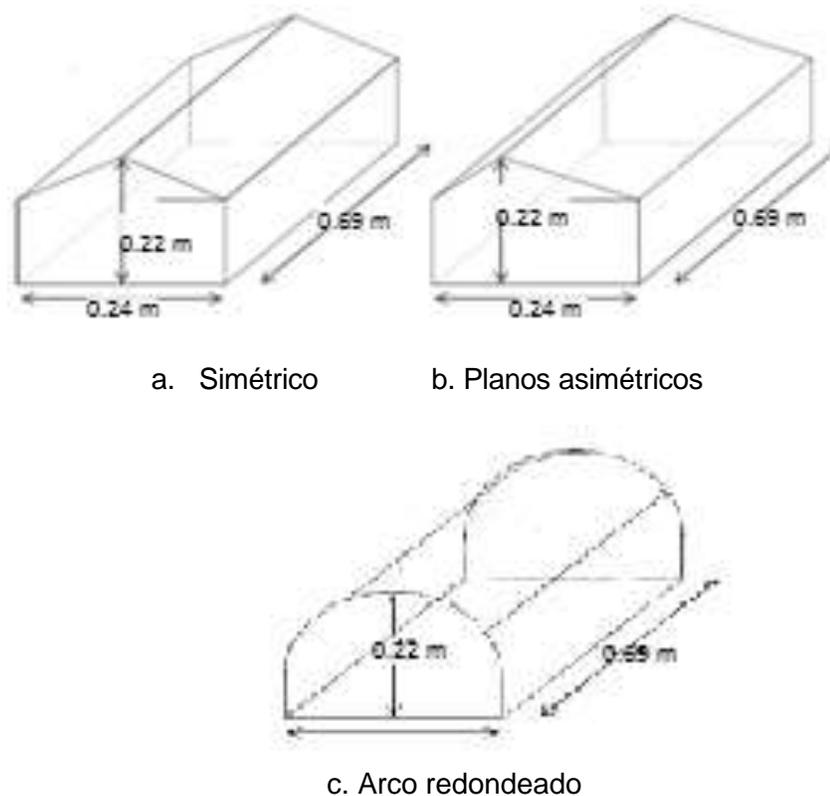
Ecuación (1) 
$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{\Delta t}$$

Ecuación (2) 
$$T_d = 0.6931 / \mu$$

### 5.3. Efecto de las cubiertas de raceways de 10 L.

#### 5.3.1. Selección de material y geometría de cubierta

Se llevó a cabo la selección de tres geometrías típicas de cubierta para invernaderos, es decir, arco redondeado, capilla y planos asimétricos (M.J. Gupta & Chandra, 2001) (figura 11).



**Figura 11.** Esquema de las geometrías de cubierta.

Dos materiales de cubierta fueron seleccionados: Polietileno de baja densidad tricapa (flexible) y PVC (rígido). Se tomaron en cuenta las características de materiales típicos usados en invernaderos como: resistencia, durabilidad, disponibilidad y fácil aplicación, así como transmisión de la luz (tabla 4 y 5).

**Tabla 4.** Características del material flexible seleccionado (Adaptado de la ficha técnica de Agrotecamac).

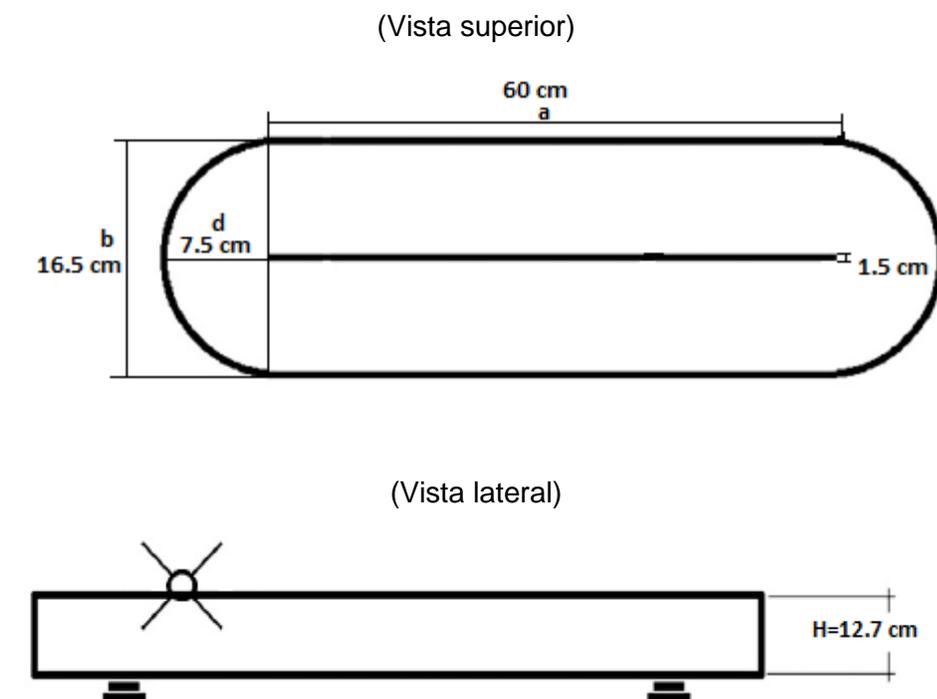
<b>PE (Polietileno de baja densidad)</b>		
Propiedades física	Densidad kg/m <sup>3</sup>	0.92
	Espesor (μ)	80
	Duración aproximada	3 años
	Resistencia a la deformación	-40+50° C
Propiedades ópticas	Transmisión de luz (%)	82
Propiedades adicionales	Efecto termoaislante, Evita la fijación al polvo, Bloquea el paso de rayos uv-a, uv-b Capa interna antigoteo.	

**Tabla 5.** Características del material rígido seleccionado (Adaptado de Agricultural plastics and meshes).

<b>PVC</b>		
Propiedades física	Densidad kg/m <sup>3</sup>	1.3
	Espesor (μ)	0.1
	Duración aproximada	2 años
	Resistencia a la deformación	-10+50° C
Propiedades ópticas	Transmisión de luz (%)	80-87

### 5.3.2. Características principales de los raceways

Se utilizaron raceways de un volumen de 10 L, con un volumen de operación de 8 L, con la siguiente configuración geométrica 12.7 cm de profundidad, 60 cm de largo y 16.5 cm de ancho, hechos de fibra de vidrio y contruidos por encima del suelo. Cada raceway fue equipado con un agitador de paletas planas, de 4 espas, de 3 cm de ancho y 12.5 de largo cada una, siendo la velocidad de mezcla constante a  $14 \text{ cm s}^{-1}$  (Figura 12):



**Figura 12.** Dimensiones de los raceways de 10 L.

Antes de cada experimento los reactores se limpiaron, con el objeto de eliminar los posibles residuos de suciedad y biomasa provenientes de experimentos anteriores, con una mezcla de agua e hipoclorito de sodio al 15%, dejando airear la mezcla por al menos 12 h. Posteriormente los reactores se vaciaron y enjuagaron con agua destilada.

### **5.3.3. Operación y monitoreo de raceways semicerrados**

Cada raceway fue inoculado al 20% (v/v) con un preinóculo crecido en FBR de 10 mL. Posterior a la inoculación se realizaron cinéticas de crecimiento, las cuales se iniciaron con un número aproximado de células de  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> ( $OD_{600} = 0.2$ ) de la cepa seleccionada, con las tres diferentes cubiertas y los dos materiales propuestos, éstas hechas por duplicado cada una, teniendo en total 6 raceways semicerrados y como control se utilizó un raceway abierto.

El trabajo experimental antes mencionado, fue desarrollado con los raceways a la intemperie (aire libre) (figura 13).

Los raceways fueron operados en 3 diferentes períodos y épocas del año, las cuales fueron:

- Cubiertas con material flexible (1) (1-18 mayo, 2012).
- Cubiertas con material flexible (2) (25 junio-13 julio, 2012).
- Cubiertas con material rígido (13-26 agosto, 2012).



**Figura 13.** Raceways semicerrados de 10 L.

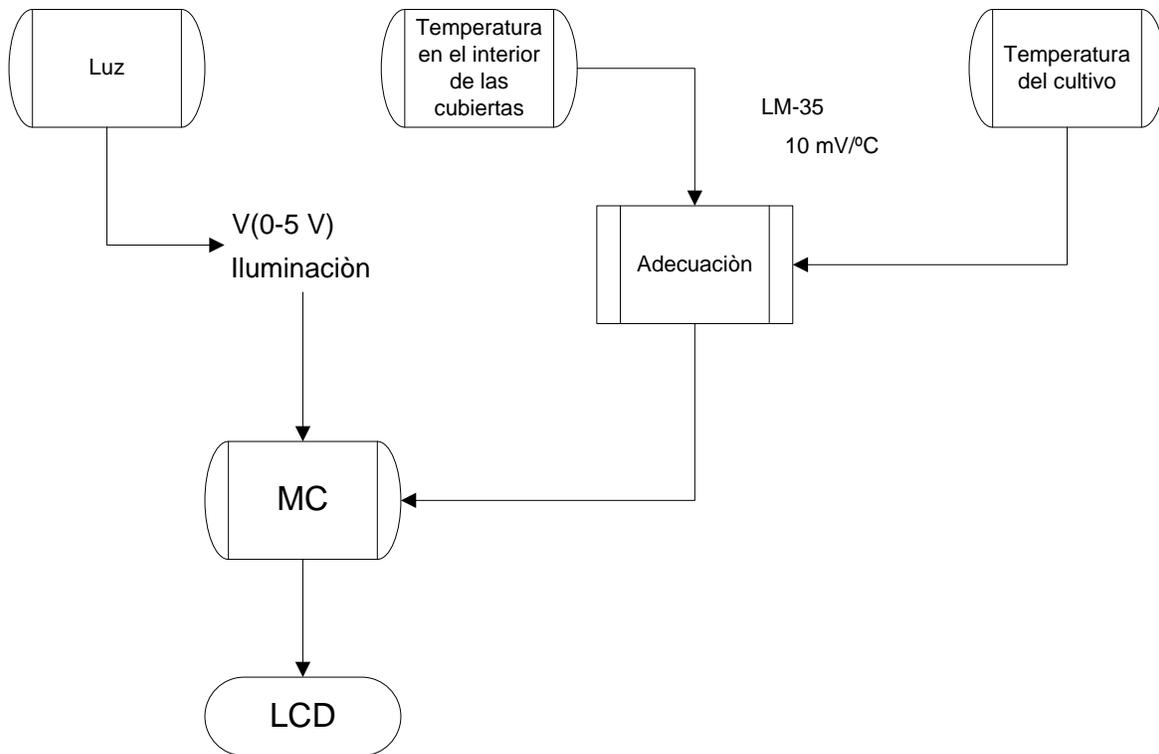
Los parámetros que se monitorearon durante la operación de los raceways fueron: densidad óptica a 600 nm, cuenta directa en cámara de Neubauer (cada 24 h) y peso seco (cada tercer día), el volumen de cultivo perdido debido a la evaporación en el sistema fue recuperado con agua destilada diariamente, la intensidad de luz y temperatura dentro de las cubiertas y del cultivo fueron medidas a las 12:00 y 19:00 h. Así mismo, al inicio, mitad y fin de cada cinética se determinó el contenido de azúcares, proteínas, lípidos en biomasa y la contaminación del medio, como se indica más adelante (Ver sección 5.5).

Se diseñaron detectores para determinar la temperatura e iluminación en el interior de los raceways y de la temperatura del medio líquido de cada uno de los raceways.

Se instrumentó un sistema de medición simultánea y en tiempo real para la temperatura dentro de las cubiertas e iluminación. Este dispositivo se diseñó de tal forma que se pudiera ajustar la señal tanto del sensor de iluminación (LX235) y el sensor de temperatura dentro de las cubiertas (LM35) a un microcontrolador (MC) con periféricos adecuados. El microcontrolador utilizado fue el de la familia PIC16F887 producido por la empresa Microchip.

A nivel de instrumentación, el sensor de iluminación solo requirió un sistema de aislamiento de impedancia basado en un seguidor no inversor por amplificadores operacionales (Boylestad, 2009). Por otro lado, el sistema de medición de temperatura requirió el uso de un amplificador no inversor con ganancia de diez acoplada a un seguidor no inversor.

Este circuito fue propuesto para poder obtener un rango dinámico de respuesta entre cero y cinco volts, que es adecuado para el convertidor analógico digital integrado al microcontrolador. Esta adecuación fue necesaria debido a que la sensibilidad de funcionamiento del sensor es de 10 mV/°C (figura 14).

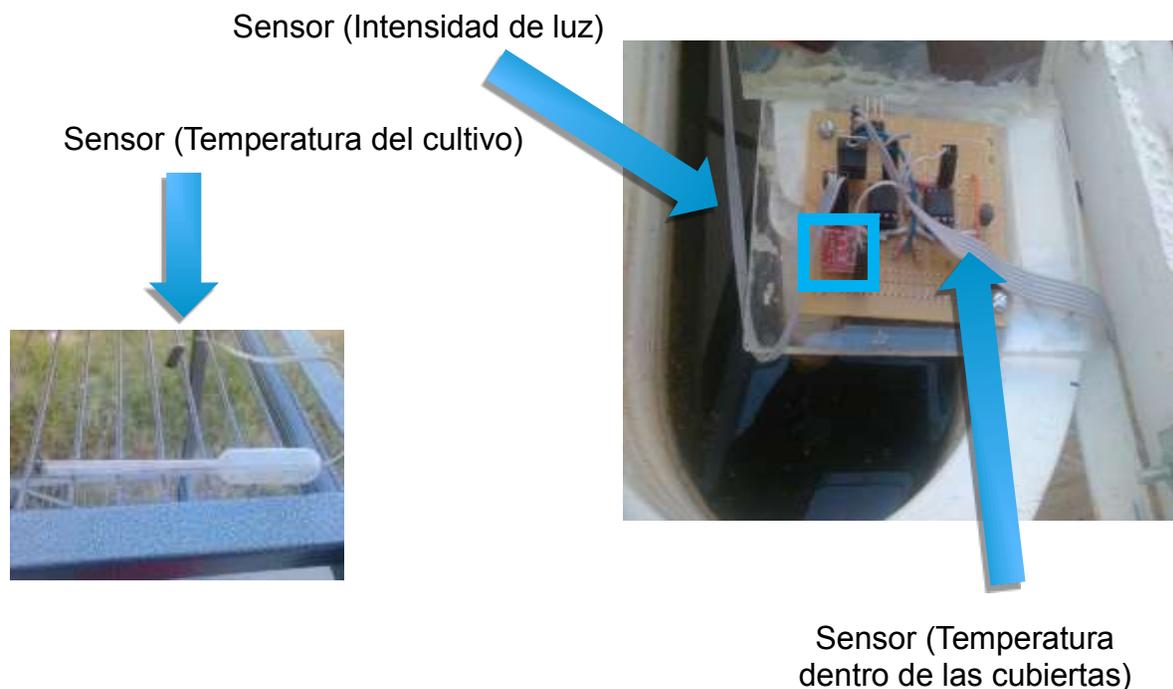


**Figura 14.** Diagrama de flujo del software integrado dentro del microcontrolador.

El software asociado al microcontrolador fundamentalmente realiza los siguientes pasos:

1. Configuración de los dos periféricos a utilizar en el funcionamiento del sensor, incluyendo tanto el convertidor analógico digital (ADC) como el puerto para la administración de la pantalla de cristal líquido.
2. Declaración de las variables a utilizar para la lectura de los valores convertidos desde el ADC, para la transformación y de esta manera mostrar los datos en la pantalla de cristal líquido.
3. Ciclo repetido donde aparecen los procesos de conversión por el ADC, transformación de los valores obtenidos a una cadena de caracteres y despliegue de los mismos en la pantalla de cristal líquido.

La Figura 15 muestra el armado integral del circuito de monitoreo de temperatura e iluminación así como el modo de fijación del sensor de temperatura sumergible.



**Figura 15.** Componentes del dispositivo electrónico instalado en los raceway de 10 L.

Con el dispositivo anteriormente descrito, se realizó el monitoreo de las variables de operación del raceway individualmente. Por lo anterior, se construyeron 6 dispositivos similares para el monitoreo de los 6 reactores considerados en este estudio.

#### **5.4. Análisis estadístico**

Los datos de irradiación solar, temperatura dentro de las cubiertas y del cultivo, evaporación del medio, biomasa, azúcares, proteínas, lípidos y contaminación se analizaron estadísticamente (ANOVA) por medio de un análisis de varianza de tres vías.

Las variables independientes fueron, tipo de raceway (sistema abierto y semicerrado), geometría y el material de la cubierta de estos sistemas. Las variables dependientes que se consideraron en el presente estudio fueron, irradiación solar, temperatura dentro de las cubiertas y del cultivo, evaporación del medio, biomasa, azúcares, proteínas y lípidos, así como la contaminación presente en los raceways.

Los datos de las variables se procesaron utilizando el programa MATLAB 7.8. El ANOVA arrojó como resultado el efecto de cada variable así mismo las interacciones de las mismas con un intervalo de confianza del 95% de confidencialidad (valores de  $p \leq 0.05$ ) o del 90% de confidencialidad (valores de  $p \leq 0.1$ )

Los datos de las variables dependientes fueron normalizados con respecto al raceway abierto.

## **5.5. Métodos analíticos**

### **5.5.1. Crecimiento microalgal**

El crecimiento microalgal fue determinado bajo distintos parámetros como: concentración celular, densidad óptica y peso seco.

### **5.5.2. Cuenta directa**

La concentración celular (células/mL) de los cultivos de *Chlorella sp.* y *Chlorococcum humicola* fue determinada mediante conteo directo en cámara de Neubauer (Richmond, 2008) con microscopio de luz, utilizando el objetivo 40X.

### **5.5.3. Densidad óptica**

La densidad óptica de la muestra, la cual se transfirió a una celda de 1.5mL, se le midió la absorbancia a 600 nm (Ríos *et al.*, 2009), empleando como blanco el medio de cultivo. Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Genesis 10 UV.

### **5.5.4. Peso seco**

Se utilizaron membranas con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , a peso constante, en las cuales se filtraron 10mL de suspensión de algas. Posteriormente se colocó la membrana a 60 °C por un periodo de 12 h. La membrana se colocó en un desecador y fue pesada en una balanza analítica. El peso seco de la muestra fue determinado por diferencia de peso (Richmond, 2008).

## **5.5.5. Contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas**

### **5.5.5.1. Extracción y determinación del contenido lipídico**

#### *Extracción en frío con hexano*

La extracción de lípidos con solventes químicos ha sido ampliamente utilizada en la extracción de aceite de microalgas, siendo el hexano uno de los más populares, es relativamente económico y fácil de recuperar después de la extracción (Salazar, 2012).

Los lípidos totales se determinaron a partir de 30mL de cultivo, las cuales fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 15 min empleando una centrifuga Hermle modelo Z300. El sobrenadante se decantó con cuidado para no perder biomasa y se puso a secar la pastilla a 40 °C durante 12 h. La biomasa seca fue triturada en el mismo tubo y se adicionaron 4mL de hexano, se agitó en vortex durante 1 min y sonicó durante 30 min, posteriormente incubó a 4 °C durante 12 h.

El hexano se recuperó en un tubo falcon de 15mL, con precaución para que no se pasara biomasa. Se lavó la pastilla celular dos veces más con 3 mL de hexano cada vez. En cada lavado, se agitó vigorosamente el solvente junto con el paquete celular. Recuperando el sobrenadante en cada ocasión y combinándolo en el tubo falcon de 15mL.

Finalmente se centrifugó a 10 000 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante en un vial seco a peso contante. El contenido lipídico (mg L<sup>-1</sup>) se determinó gravimétricamente después de evaporar el solvente bajo una corriente de gas Nitrógeno.

### **5.5.5.2. Determinación del contenido carbohidratos y proteínas.**

El análisis del contenido de carbohidratos y proteínas se realizó a partir de 15mL de cultivo, los cuales fueron centrifugados a 10 000 rpm durante 15 min empleando una centrifuga Hermle modelo Z300. Posteriormente la muestra se decantó con cuidado para no perder biomasa y se puso a secar la pastilla a 40 °C durante 12 h.

Para el contenido de carbohidratos la biomasa seca fue triturada en el mismo tubo y se le adicionó una solución de HCl 2N. Posteriormente se hidrolizó la biomasa en un baño a 100 °C durante 1 h. La determinación del contenido de carbohidratos se realizó a partir de los hidrolizados ácidos.

Se colocó 1mL del hidrolizado en tubos de ensayo limpios y secos (tubos altos para evitar que se perdiera parte de la muestra debida a la proyección durante la reacción exotérmica). Posteriormente se le adicionaron 0.5mL de una solución de fenol al 5%, posteriormente de forma rápida y directa se vierten 2.5mL de ácido sulfúrico concentrado, evitando que el ácido resbalara por las paredes del tubo de ensayo. Se dejó reposar la muestra por 15 min y se leyó a 492 nm empleando como blanco agua a la cual se le hizo también la reacción.

Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Genesys 10 UV. La curva patrón de 0 a 200 µg/mL se hizo a partir de una solución estándar de glucosa al 0.1% (1 mg/mL) preparada con agua milliQ (Dubois, 1956).

Para el contenido de proteínas 0.1 g de la biomasa seca, fue triturada y se le adicionó 1mL de NaOH 1M. Posteriormente se hidrolizó la biomasa en un baño a 100 °C durante 1 h.

Las muestras se trataron acorde con la técnica de Bradford la cual está basada en el cambio de absorbancia (466nm a 595nm) de una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G250 (contenida en el reactivo de Bradford) (Bradford, 1976).

Se leyó a 592 nm empleando como blanco agua a la cual se le hizo también la reacción. Las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Genesys 10 UV. La curva patrón se hizo de 0 a 500 µg/mL a partir de una solución estándar de albúmina de suero bovino (BSA).

### **5.5.5.3. Contaminación por otras especies de microalgas y bacterias**

Se comprobó que no hubiera contaminación con otras microalgas, observando la muestra en un portaobjetos con microscopio de luz, utilizando el objetivo 40X.

#### *Recuento bacteriano*

Se diluyó 1mL del cultivo en 9mL de solución salina al 85% (8.5 g de NaCl en 1000mL de agua), y así consecutivamente hasta alcanzar una dilución de  $1 \times 10^3$ . Para esta evaluación se utilizó agar nutritivo (AN), el cual se preparó a una concentración de 15 g/L, se esterilizó en autoclave a 121°C y a una presión de 15 psi durante 20 min (Gerhardt *et al.*, 1981).

Las tres diluciones se colocaron en cajas de Petri en condiciones de esterilidad, al gelificarse se incubaron a 28°C durante 48 h. Después de ese período, las colonias fueron contadas y registradas como UFC/mL de cultivo.

#### *Tinción gram*

Las colonias se seleccionaron por su color y / o morfologías, las cuales fueron caracterizadas mediante la técnica de Gram para la separación de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Se colocaron dos gotas de agua destilada en el extremo de un portaobjetos, se disolvió en ella una muestra de una colonia representativa de una placa. Se tomó una muestra con asa bacteriológica, se preparó el frotis y se fijó a la flama. Se cubrió la preparación con cristal violeta durante 10 min. Se escurrió el colorante y se lavó el frotis con agua corriente o destilada. Se cubrió con lugol y se lavó nuevamente. Se decoloró con alcohol etílico, procurando no lavar todo el colorante. Se cubrió el frotis con la solución de fucsina por 30 s. Se escurrió el colorante y se lavó una vez más. Se dejó secar la preparación y se examinó al microscopio a 100X (Gerhardt *et al.*, 1981).

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Selección de la cepa

La selección de la cepa se llevó a cabo tomando en cuenta la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), el tiempo de duplicación ( $T_d$ ), la productividad de biomasa y la sensibilidad del cultivo a la contaminación (tabla 6), de dos cepas *Chlorococcum humicola* y *Chlorella sp.*, crecidas en fotobiorreactores de 2 L operados a un volumen de 1.6 L.

La fase exponencial de *Chlorella sp.* duró 25 días, iniciando desde la inoculación de los raceways, este comportamiento fue similar a lo reportado por Vera *et al.* (2006), en el cual utilizaron *Chlorella sp.* en fotobiorreactores de 300mL, variando la composición del medio de cultivo y obteniendo una fase exponencial de 25 días. Para *Chlorococcum humicola* la fase exponencial solo duró 6 días, e igualmente inició inmediatamente después de la inoculación de los raceways, este resultado fue mejor que lo reportado por Mahapatra & Ramachandra, 2013, en el cual utilizaron *Chlorococcum sp* en fotobiorreactores de 1 L y obtuvieron una fase exponencial de 8 días.

*Chlorococcum humicola* presentó una velocidad de crecimiento 50% mayor que *Chlorella sp.*, para *C. humicola* el tiempo de duplicación fue menor de 1.5/día y la productividad de biomasa fue mayor de 0.047 g/L/d, respecto a *Chlorella sp.* esto hace que el cultivo de *C. humicola* sea viable económicamente y de más fácil adaptación para ser utilizado como inóculo en cultivos masivos.

Se determinó la contaminación por algas, protozoarios y bacterias; el cultivo de *Chlorella sp* fue más susceptible a contaminarse a pesar de que se produjo una alta densidad celular con esta cepa. Se ha reportado que una alta densidad de algas disminuye significativamente el riesgo de contaminación por organismos indeseables en el cultivo (Doucha, J., & Lívanský, K., 2006).

De acuerdo con los resultados obtenidos y a lo ya reportado (Harwati, Willke, & Vorlop, 2012; Jena *et al.*, 2012; Laurens & Wolfrum, 2011; Knothe, 2005), se seleccionó la cepa *C. humicola* para ser cultivada en raceways semicerrados.

**Tabla 6.** Parámetros cinéticos.

	<i>C. humicola</i>	<i>Chlorella sp.</i>
Velocidad de crecimiento, $\mu$ , ( $d^{-1}$ )	0.460	0.210
Tiempo de duplicación, $T_d$ , ( $d^{-1}$ )	1.507	3.279
Productividad de biomasa, $g L^{-1} d^{-1}$	0.047	0.0304

## 6.2. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en el cultivo de *Chlorococcum humicola*

Para determinar el efecto del tipo de sistema (abierto y semicerrado) y las geometrías de las cubiertas en el cultivo de *Chlorococcum humicola* se desarrollaron tres experimentos en los raceways en los meses de mayo y junio del 2012 para el material flexible y en agosto para el material rígido (sección 5.4.3).

Las variables consideradas fueron: irradiación solar, temperatura dentro de las cubiertas y del cultivo, evaporación del medio, biomasa, azúcares, proteínas y lípidos celulares, así como la contaminación presente en los raceways. Las cuales se determinaron de acuerdo con la metodología ya establecida (ver sección 5).

Las cinéticas de crecimiento de las microalgas en raceways con cubiertas de material flexible se llevaron a cabo en 2 períodos. El primer período de operación de los raceways correspondió al mes de mayo del 2012 denominado en lo consecutivo como **flexible 1**. El segundo período de operación fue del 25 de junio al 13 de julio del 2012, denominado **flexible 2**.

Debido a que la época del año, aún los cambios climáticos diarios, tiene un efecto importante en los cultivos, no se consideraron duplicados y se proporcionan a continuación los resultados de cada sistema por separado: semicerrado con cubierta flexible 1 (6.2.1), posteriormente flexible 2 (6.2.2), seguido por la cubierta rígida (6.2.3). Finalmente se integran los parámetros comparables entre sistemas (6.3).

### **6.2.1. Sistemas semicerrados con material flexible 1**

#### **6.2.1.1. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar, temperatura en el interior de las cubiertas y del cultivo**

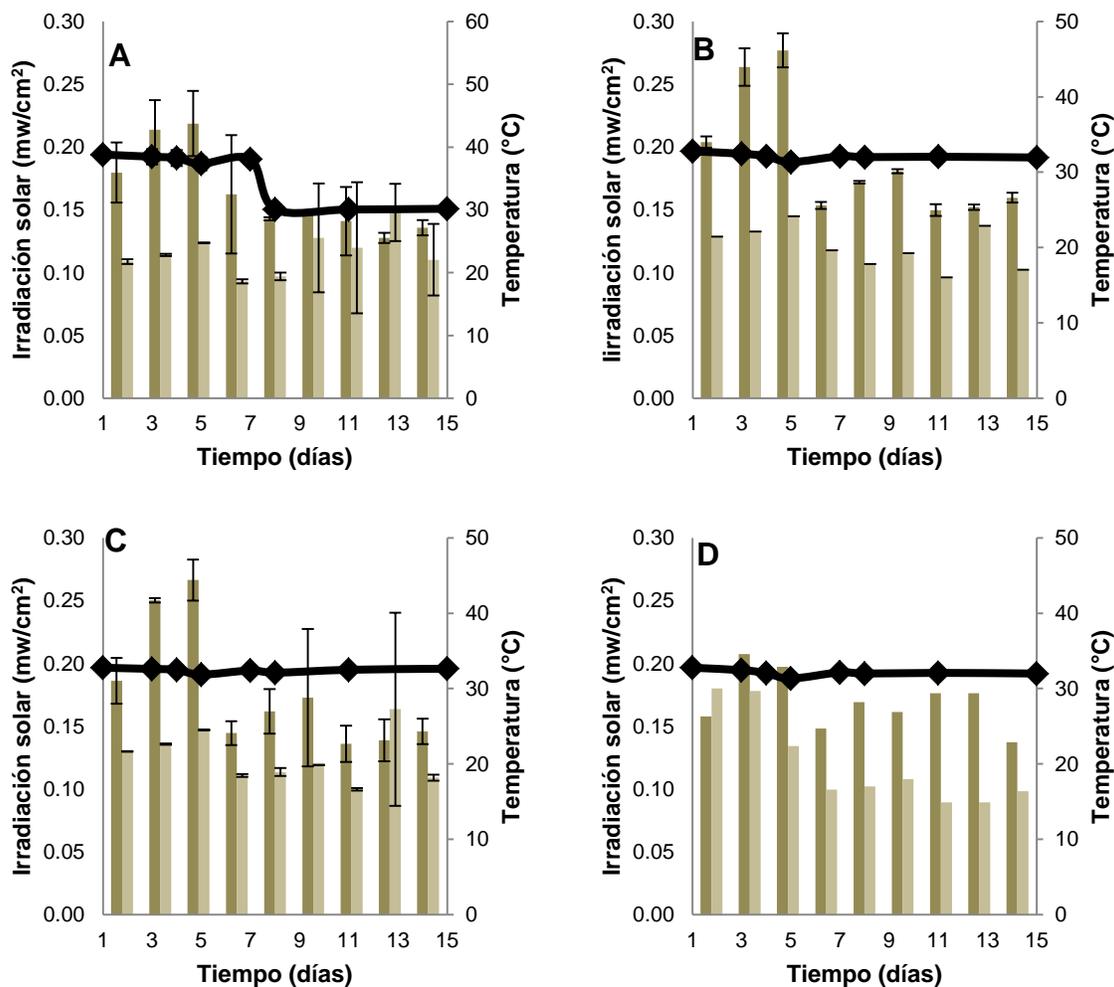
Los factores que juegan un papel importante en el cultivo de microalgas son la irradiación solar y la temperatura atmosférica, estos impactan directamente sobre el crecimiento y productividad de biomasa. Durante el proceso de fotosíntesis las microalgas necesitan ciclos de luz/oscuridad, durante el ciclo de luz se lleva a cabo la fase fotoquímica en la cual se produce adenosina trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH) y en el ciclo de oscuridad se sintetizan moléculas esenciales para el crecimiento (Cheirsilp *et al.* 2012). Los cambios en las temperaturas impactan en la productividad de biomasa microalgal y en la estructura de proteínas y lípidos; el calor y el frío pueden retardar el crecimiento de las microalgas y causar daños en la célula; sin embargo la fisiología de algunas especies permite adaptarse a temperaturas extremas (Singh *et al.* 2011).

El efecto por el tipo de sistema (abierto o semicerrado) en la irradiación solar no fue significativo ( $p \geq 0.05$ ), durante los 15 días de operación de los raceway. En los raceways abiertos (control), con cubiertas capilla y arco redondeado el valor de la irradiación solar recibida a las 12:00 h se mantuvo constante a  $0.190 \text{ mW/cm}^2$  durante todo el período de operación de los sistemas (Figura 16).

El tipo de geometría de cubierta no presentó un efecto significativo ( $p \geq 0.05$ ) en la irradiación solar recibida por los RW; sin embargo en los raceway con geometría de cubierta planos asimétricos el valor máximo registrado de irradiación fue de  $0.190 \text{ mW/cm}^2$ , el cual se mantuvo hasta el día 7 y posteriormente disminuyó a  $0.150 \text{ mW/cm}^2$  (Figura 16).

EL tipo de sistema y de geometría no presentaron un efecto significativo ( $p \geq 0.05$ ) en la temperatura en el interior de las cubiertas; sin embargo en los raceways con geometría de cubierta planos asimétricos la temperatura en el interior fue 15% mayor que en los otros sistemas (Figura 16).

La temperatura del medio de cultivo se mantuvo en un intervalo de temperatura de 20 a  $30^\circ\text{C}$ , en todos los sistemas (Figura 16). Estas temperaturas se encuentran en el intervalo óptimo que va de  $25\text{-}30^\circ\text{C}$  para facilitar el crecimiento de algunas especies de microalgas, incluyendo las algas verdes como *Chlorococcum humicola* (Cassidy, 2011; Kirrolia *et al.*, 2012).



**Figura 16.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar (◆), temperatura en el interior de la cubierta (■), temperatura del cultivo (■), y las geometrías de cubierta: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y sistema abierto (control) (D).

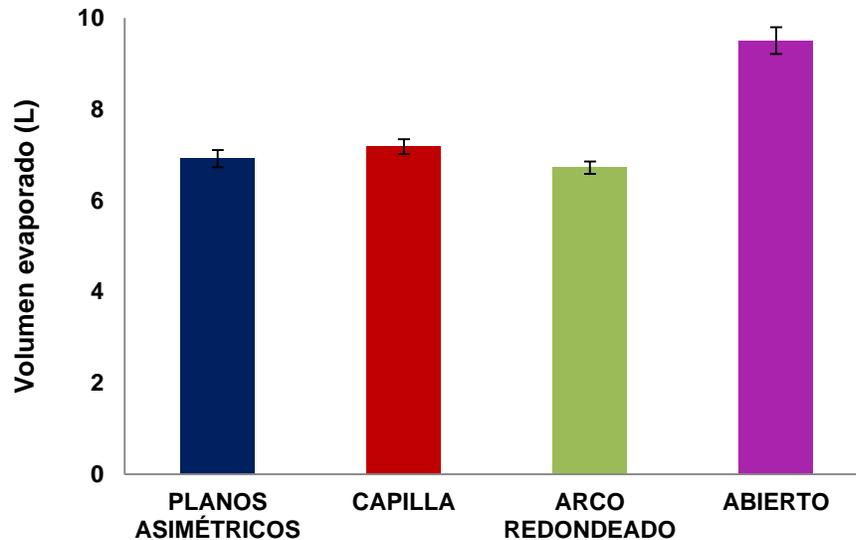
### **6.2.1.2. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la pérdida de agua por evaporación**

La evaporación es un factor importante que da lugar a cambios significativos en el crecimiento de las microalgas, ya que la evaporación del medio provoca un incremento en la salinidad, el cual puede afectar la composición de las células al generar estrés osmótico, mejorando la biosíntesis de lípidos y el contenido de carbohidratos (Ozkan, A., Kinney, K., Katz, L., & Berberoglu, H, 2012).

Respecto a la evaporación del agua, el raceway abierto tuvo una mayor pérdida (30% del volumen total), respecto a los sistemas semicerrados (Figura 17). Esta pérdida de agua en el sistema abierto se debió principalmente a que estuvo expuesto a la intemperie, por tal motivo aumentó la cantidad de agua suministrada para restituir el medio de cultivo evaporado. De esta manera, aumenta el costo y se requiere de energía adicional en el proceso para la producción de biocombustibles.

El efecto del tipo de geometría de cubierta en la evaporación no fue estadísticamente significativo ( $p=0.1696$ ). La geometría de arco presentó una pérdida diaria ( $450 \pm 140$  mL). En el caso de planos asimétricos la evaporación diaria fue de  $460 \pm 100$  mL. Para el caso de capilla el volumen evaporado diariamente fue de  $480 \pm 160$  mL (Figura 17).

Con las cubiertas propuestas y las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo el crecimiento de *Chlorococcum humicola*, se logró reducir la pérdida por evaporación y, por lo tanto, el suministro de agua, y la energía requerida para mantener el crecimiento y la productividad de biomasa microalgal.



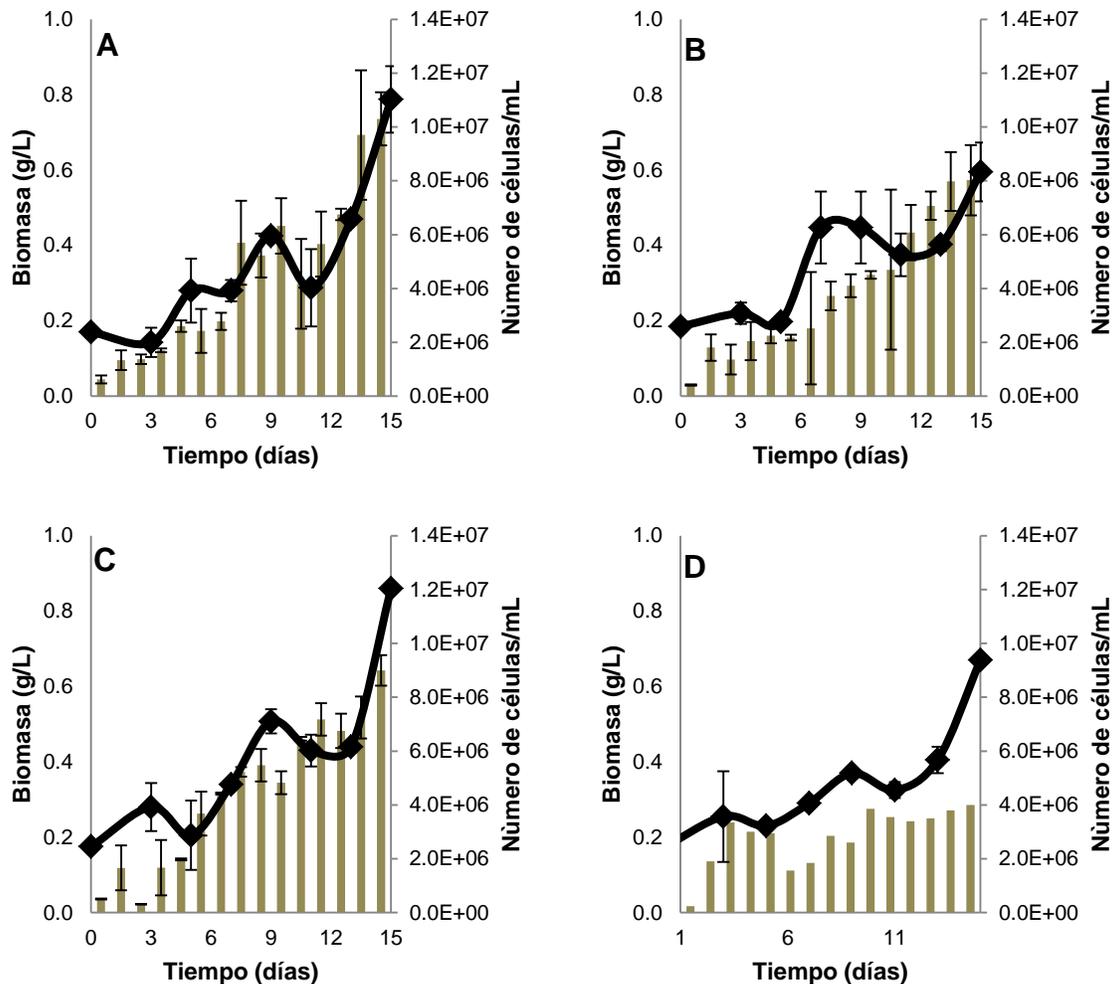
**Figura 17.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la pérdida total de agua por evaporación durante el cultivo de *Chlorococcum humicola*.

### **6.2.1.3. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la cantidad de biomasa**

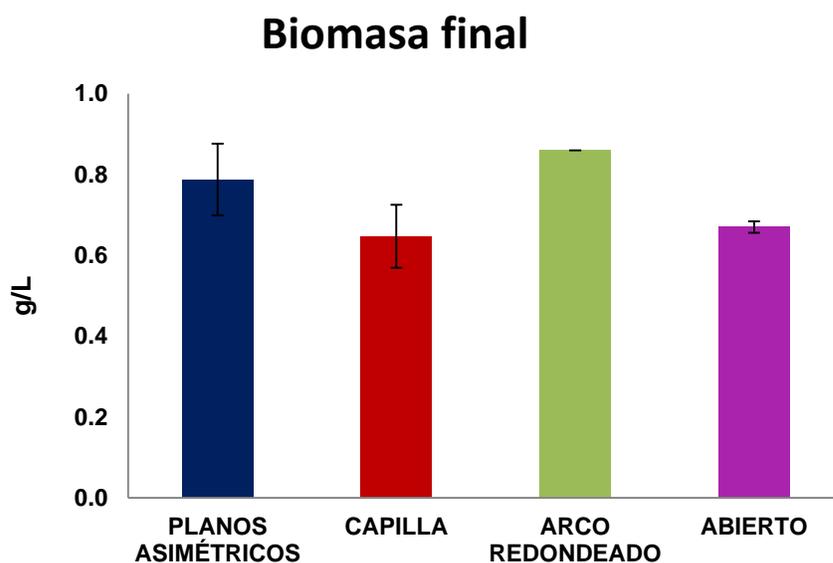
La biomasa de algas parece ser la única fuente renovable para producir biodiesel y que es capaz de satisfacer la demanda a nivel mundial (Schenk *et al.*, 2008). Teniendo un rápido crecimiento y alta productividad de biomasa se aumenta el rendimiento por unidad de volumen del cultivo y por lo tanto disminuye el costo en el proceso de producción de biocombustibles a partir de microalgas.

La biomasa final no varió significativamente por el tipo de geometría de cubierta ( $p=0.8$ ); sin embargo, los raceways con geometría arco redondeado, presentaron un incremento en el número de células de  $5e10^5$  células/mL a  $9e10^6$  células/mL (Figura 18) y la cantidad de biomasa al final de la cinética fue la mayor ( $0.860 \text{ g L}^{-1}$ ) (Figura 19), lo cual significa un incremento del 20% a 30% mayor que en los otros sistemas.

Las velocidades de crecimiento de la cepa variaron poco entre los sistemas de 0.560 a 0.592 d<sup>-1</sup>(Tabla 7). Este crecimiento fue más lento respecto a *Chlorococcum infusorium* en fotobiorreactores de 32 L de 0.72 d<sup>-1</sup>. (Ortega & Reyes, 2012).



**Figura 18.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la concentración de biomasa (—◆—), número de células (■) de *Chlorococcum humicola* y las geometrías evaluadas: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y el control (D).



**Figura 19.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la cantidad biomasa al final del cultivo de *Chlorococcum humicola*.

**Tabla 7.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en el crecimiento de *Chlorococcum humicola*.

	Planos asimétricos	Capilla	Arco redondeado	Control (abierto)
Velocidad de crecimiento, $\mu$ , (d <sup>-1</sup> )	0.560	0.592	0.572	0.563
Tiempo de duplicación, T <sub>d</sub> (d <sup>-1</sup> )	1.237	1.170	1.203	1.232
Productividad de biomasa (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	0.053	0.043	0.06	0.045

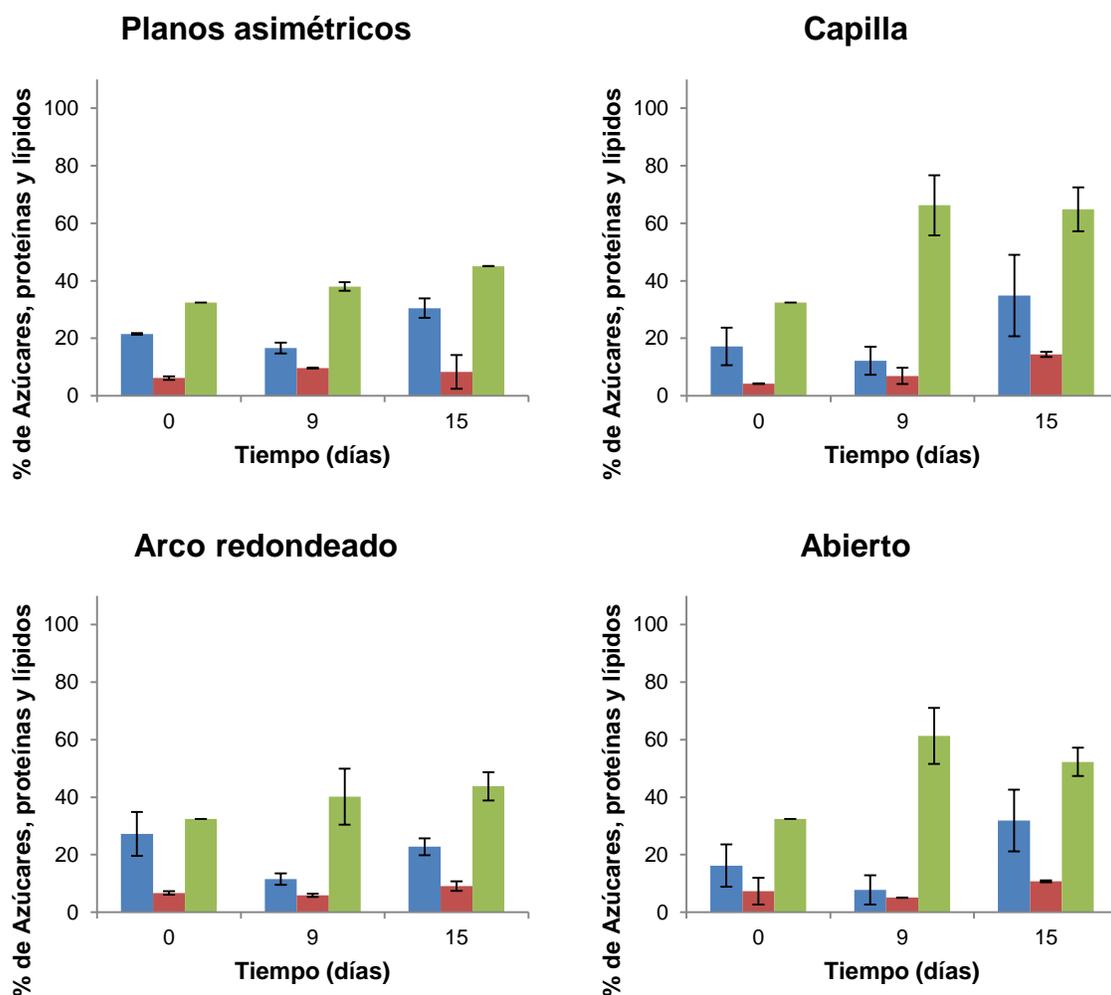
#### **6.2.1.4. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos**

Las microalgas están constituidas principalmente de carbohidratos, proteínas y lípidos. Los lípidos generalmente se clasifican en lípidos neutros, polares, esteroides e hidrocarburos. Los lípidos no polares se encuentran principalmente en forma de triacilglicéridos (TAG) saturados e insaturados. Su biosíntesis en microalgas está relacionada indirectamente al proceso de conversión de la energía solar en energía química, vía fotosíntesis, ya que en condiciones estándar, la fase de crecimiento exponencial se obtiene después de 5 a 7 días; este tiempo dependerá principalmente del tamaño del inóculo, medio de cultivo, temperatura, iluminación así como también de la tasa de crecimiento de la especie (Salazar, 2012). A partir de la transesterificación de los triglicéridos, se pueden obtener diversos productos de alto valor agregado como el biodiesel y glicerol. Sin embargo, la cantidad y calidad del biodiesel producido varía entre especies y cepas.

El efecto del tipo de sistema (abierto y semicerrado) y geometrías de cubierta en el contenido celular de carbohidratos, proteínas y lípidos no fue significativo ( $p \geq 0.05$ ).

Para todos los sistemas, la cantidad de proteínas no fue mayor a 0.2 mg de proteína/ mg de biomasa seca y el contenido de carbohidratos disminuyó de 0.2 a 0.15 mg de azúcar/ mg de biomasa seca a los 8 días posteriores a la inoculación de los raceways. Al final del experimento aumentaron a 0.3 mg de azúcar/ mg de biomasa (Figura 20). Esta disminución se debe al rápido consumo de nutrientes, lo cual propicia condiciones de estrés celular y por tanto un aumento durante las etapas posteriores del cultivo (Valenzuela, Cruz, Millan, & Núñez, 2005).

Si bien el efecto debido al tipo de sistema no fue significativo (abierto y semicerrado) y geometrías de cubierta en el contenido celular de lípidos. Los raceways con geometría capilla, presentaron la mayor cantidad de lípidos totales (65%), esto fue 20% mayor, si se compara con las otras geometrías.



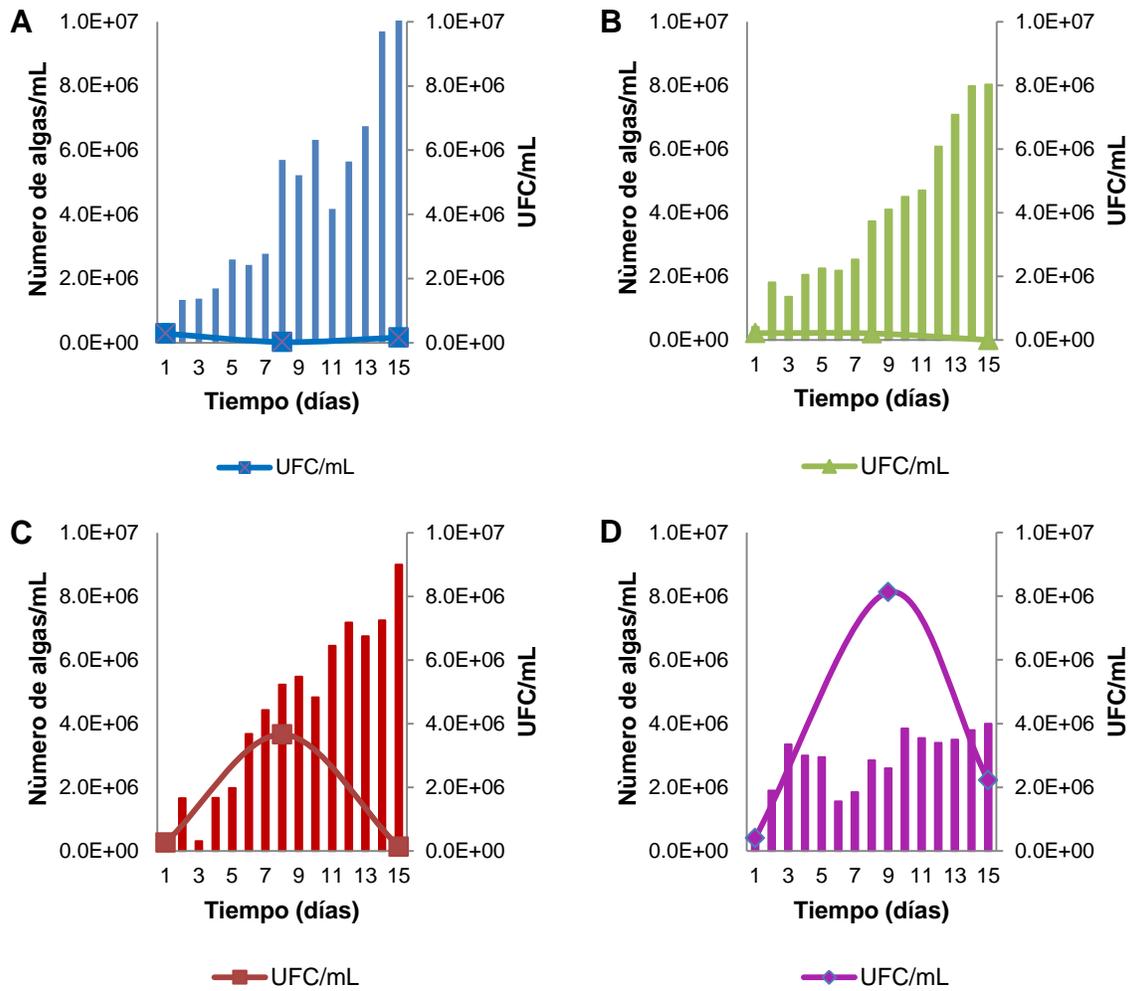
**Figura 20.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubierta en el contenido de carbohidratos (■), proteínas (■) y lípidos (■) de *Chlorococcum humicola*.

#### **6.2.1.5. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la contaminación de los sistemas**

Controlar la contaminación por microorganismos heterótrofos, otras especies de algas protozoos o rotíferos es uno de los retos para el cultivo de microalgas en sistemas abiertos. Los sistemas semicerrados ofrecen tener un control más estricto que en cultivos abiertos, incrementando la concentración celular, reduciendo la contaminación y, por lo tanto, la pérdida del cultivo (Mata, 2010).

En los raceways abiertos, la contaminación bacteriana fue 60% mayor que en los sistemas semicerrados. Para todos los sistemas, la contaminación bacteriana aumentó un 80% a los 8 días de cultivo y posteriormente disminuyó un 40% al final del experimento (Figura 21).

En los raceways abiertos se observó una disminución en el crecimiento de *Chlorococcum humicola* con el aumento en el número de bacterias/mL (Figura 21D). Este comportamiento es igual si se compara con lo reportado por Rhee, (1972), quien estudió *Scenedesmus sp.* y *Pseudomonas sp.* en cultivos puros y mixtos y obtuvo que el crecimiento de algas se vio severamente limitado por la presencia de bacterias.



**Figura 21.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la contaminación del cultivo de *Chlorococcum humicola*.

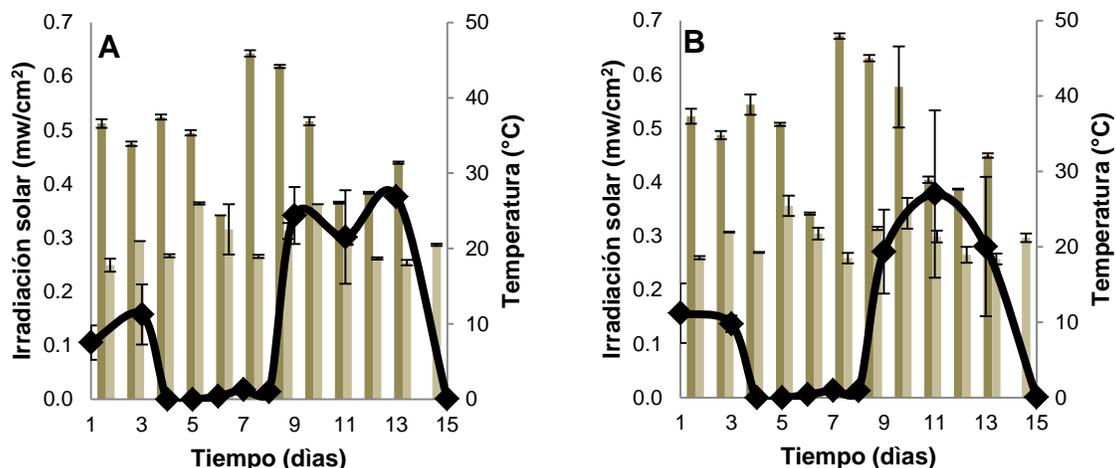
## 6.2.2. Sistemas semicerrados con material flexible 2

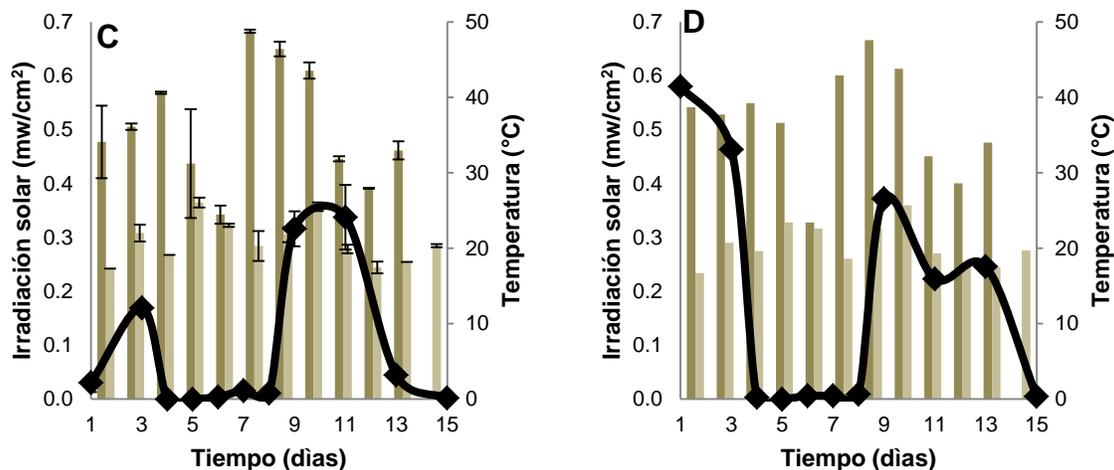
### 6.2.2.1. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar, temperatura en el interior de las cubiertas y del cultivo

Como ya se describió (sección 5.3.3.), los raceways fueron operados a cielo abierto, para este caso el período en el que se llevó a cabo la cinética hubo varios días nublados y con lluvia, representando diferencias importantes en la irradiación y temperatura, factores no controlables, respecto al experimento 1.

La irradiación solar fue 60% mayor en el raceway abierto que para los sistemas semicerrados. Para todos los sistemas, hubo baja o nula disponibilidad de intensidad de la irradiación solar del día 3 hasta el día 8 de operación de los raceways y un aumento de aproximadamente a 0.4 mW/cm<sup>2</sup> al final del experimento. (Figura 22).

La temperatura en el interior de las cubiertas fue de aproximadamente 35°C y la temperatura del medio de cultivo de 20°C, durante todo el período de operación de los raceways. Esta temperatura se considera adecuada para el crecimiento de *Chlorococcum humicola* (Jena et al., 2012; Kirrolia et al., 2012; Martin et al., 2007).



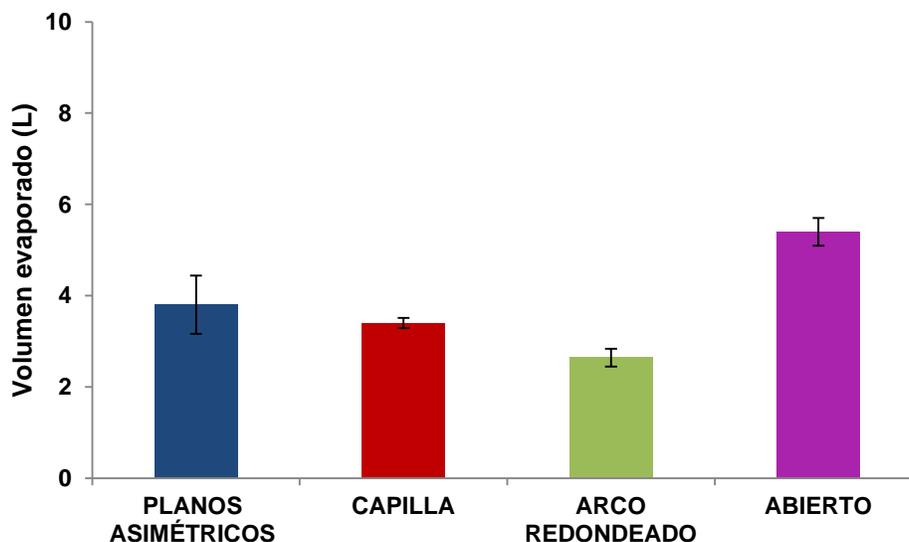


**Figura 22.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar (—◆—), temperatura en el interior de la cubierta (—■—), temperatura del cultivo (—■—), y las geometrías de cubierta: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y sistema abierto (control) (D).

#### **6.2.2.2. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la pérdida de agua por evaporación**

La amplia cobertura de nubes y precipitación pluvial en el período de esta prueba (Julio), generó que durante ciertos días de operación se tuviera un efecto en la cantidad de agua pérdida por evaporación en todos los sistemas (abiertos y semicerrados). Para todos los sistemas la pérdida de agua por evaporación fue 40% menor, en relación al experimento 1 (Mayo).

En los raceways semicerrados la pérdida por evaporación fue 40% menor que los abiertos (Figura 23). La cubierta de arco redondeado fue el sistema que presentó el menor volumen perdido por evaporación diaria ( $320 \pm 0.04$  mL) (Figura 23). Por lo que esta configuración geométrica podría considerarse como la mejor para evitar pérdidas por evaporación del cultivo de *Chlorococcum humicola* a un volumen de operación de 8 L.



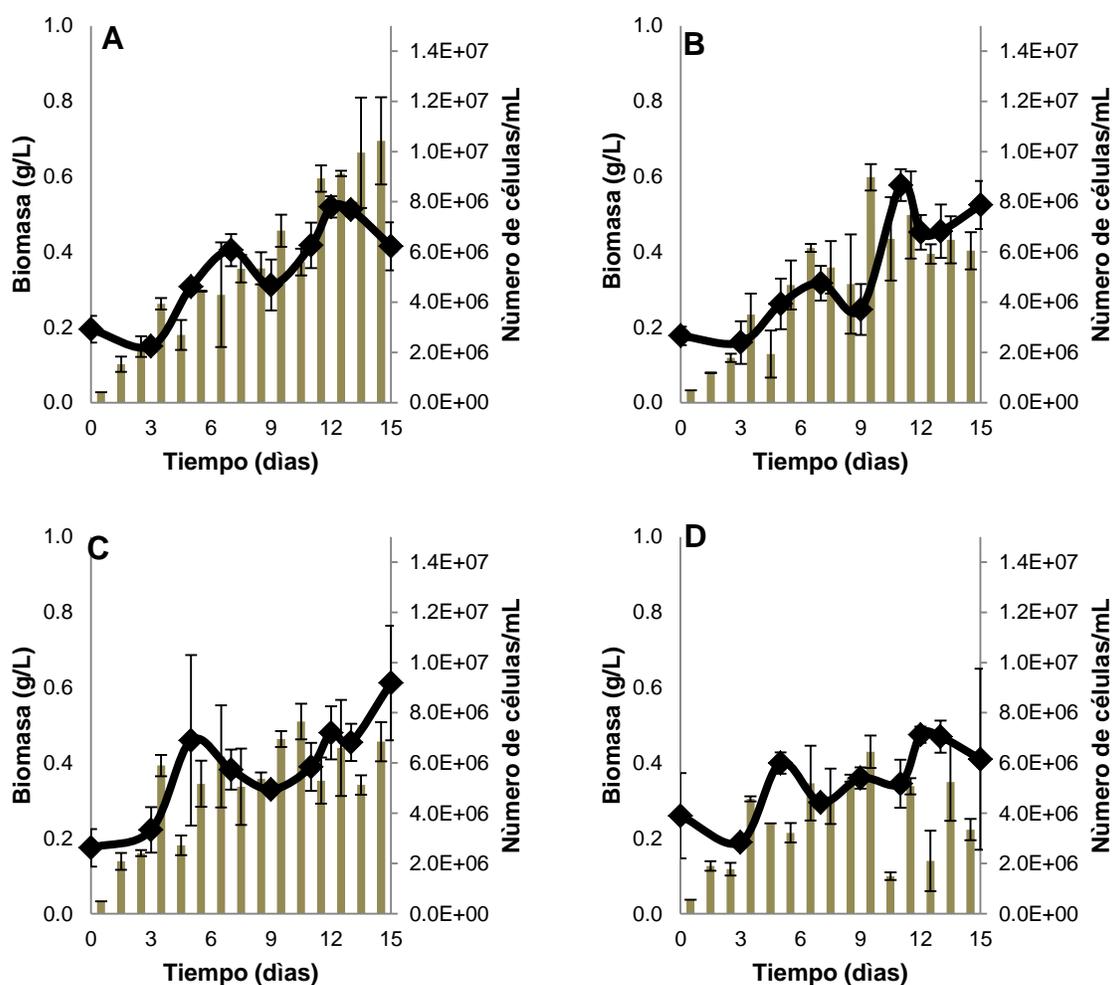
**Figura 23.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la pérdida total de agua por evaporación durante el cultivo de *Chlorococcum humicola*.

### **6.2.2.3. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías en el rendimiento de biomasa**

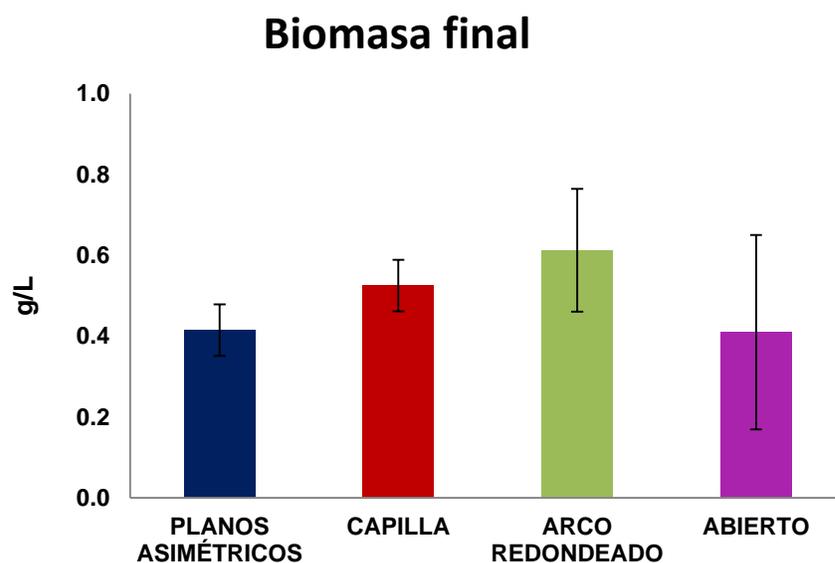
Los resultados del análisis ANOVA muestran que no hubo un efecto significativo ( $p \geq 0.05$ ) por el tipo de geometría de cubierta en la biomasa final. Sin embargo, la velocidad de crecimiento fue mayor ( $0.642 \text{ d}^{-1}$ ) en los raceways con geometría de cubierta planos asimétricos. Este resultado fue 20% mayor que el de las otras geometrías y 40% mayor a la del raceway abierto (Tabla 8). Así mismo, la cantidad de biomasa al final de la cinética fue de  $0.613 \text{ g L}^{-1}$ , 20% más que en los otros sistemas (Figura 25).

Respecto al incremento en el número de células, con la cubierta planos asimétricos la máxima concentración de algas fue de  $1.0 \times 10^7$ , la cual se obtuvo hasta el final del experimento, para el caso de capilla, este máximo se alcanzó en el día 10 con una subsecuente disminución en los días posteriores. Para el caso de arco redondeado, la concentración de algas promedio se mantuvo constante a partir del día 7. Para el sistema abierto, se alcanzó un máximo en el día 6 y posteriormente se tuvo un comportamiento decreciente.

En los raceways con geometría arco redondeado se obtuvo la mayor productividad de biomasa  $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  este valor es 40% menor que lo reportado por Arugmugam *et al.* (2011), quienes también cultivaron *Chlorococcum humicola* en estanques abiertos, los cuales fueron operados a la intemperie. Así mismo Harwati *et al.* (2012), crecieron *Chlorococcum sp.* en matraces de 300 mL, obteniendo una productividad de biomasa de  $175 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , 80% mayor que la productividad de biomasa máxima obtenida en los sistemas abiertos de 10 L (Tabla 9).



**Figura 24.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la concentración de biomasa (—◆—), número de células (■) y las tres geometrías de cubierta evaluadas: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y el control (D).



**Figura 25.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la cantidad biomasa al final del cultivo de *Chlorococcum humicola*.

**Tabla 8.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en el crecimiento de *Chlorococcum humicola*.

	Planos asimétricos	Capilla	Arco redondeado	Control (abierto)
Velocidad de crecimiento, $\mu$ , ( $d^{-1}$ )	0.642	0.503	0.523	0.358
Tiempo de duplicación, $T_d$ ( $d^{-1}$ )	1.079	1.379	1.324	1.937
Productividad de biomasa ( $g L^{-1} d^{-1}$ )	0.028	0.035	0.04	0.027

**Tabla 9.** Productividad de biomasa obtenida en otros estudios

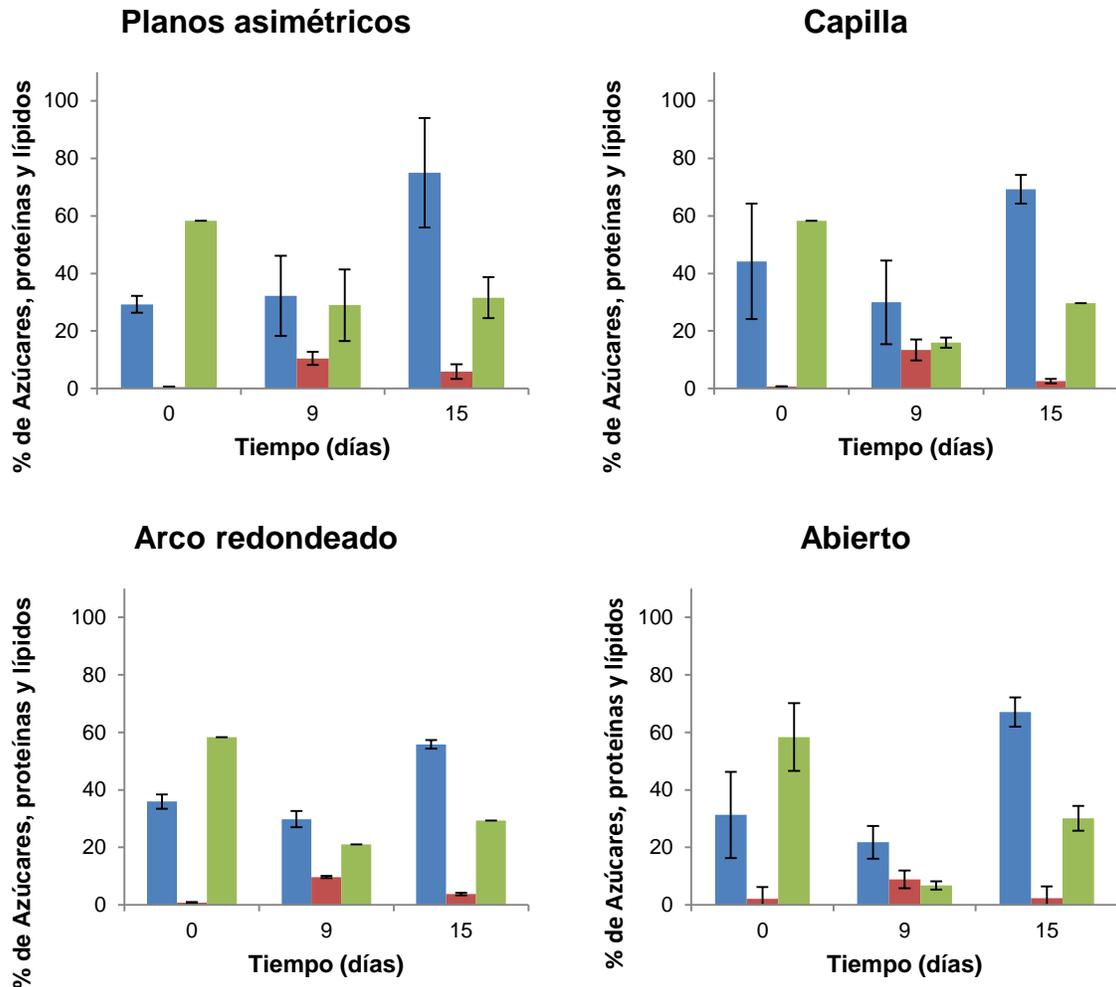
Referencias	Cepa	Productividad (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Tipo de sistema	Volumen
(Arumugam <i>et al.</i> 2011)	<i>C.humicola</i>	70	Estanques abiertos	---
(Harwati <i>et al.</i> , 2012)	<i>Chlorococcum sp.</i>	175	Matraz Erlenmeyer	300 mL
(Mahapatra <i>et al.</i> 2013)	<i>Chlorococcum sp.</i>	90	FBR	1 L
El presente trabajo	<i>C. humicola</i>	30-40	Raceway semicerrado	10 L

#### **6.2.2.4. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos**

En los raceways con geometría de cubierta plano asimétrico el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos fue 20% mayor que en los otros sistemas. La cantidad de carbohidratos obtenida en este sistema aumentó al final del experimento de un 30% a 75% de azúcares totales y el contenido de proteínas obtenido de aproximadamente 0.045 mg/mL (Figura 26). Estos resultados son mejores a lo obtenido por Kirrolia *et al.* (2012), quienes obtuvieron del 8 al 13% de azúcares totales y 0.021 mg/mL de proteínas totales con *Chlorococcum sp.*

La máxima productividad lipídica fue cercana a 150 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Valor 20 veces mayor que lo reportado por Arumugam *et al.* (2011), quienes también cultivaron *Chlorococcum humicola* en estanques abiertos, obteniendo 7 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Otro trabajo con el cual se comparan los resultados obtenidos en el presente trabajo es el reportado por Harwati *et al.* (2012) quienes cultivaron *Chlorococcum sp.* en

matraces de 300 mL, obteniendo una productividad de lípidos de  $98 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , 40% menor que la productividad de lípidos obtenida en el presente trabajo (Tabla 10).



**Figura 26.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubierta en el contenido de carbohidratos (■), proteínas (■) y lípidos (■) de *Chlorococcum humicola*.

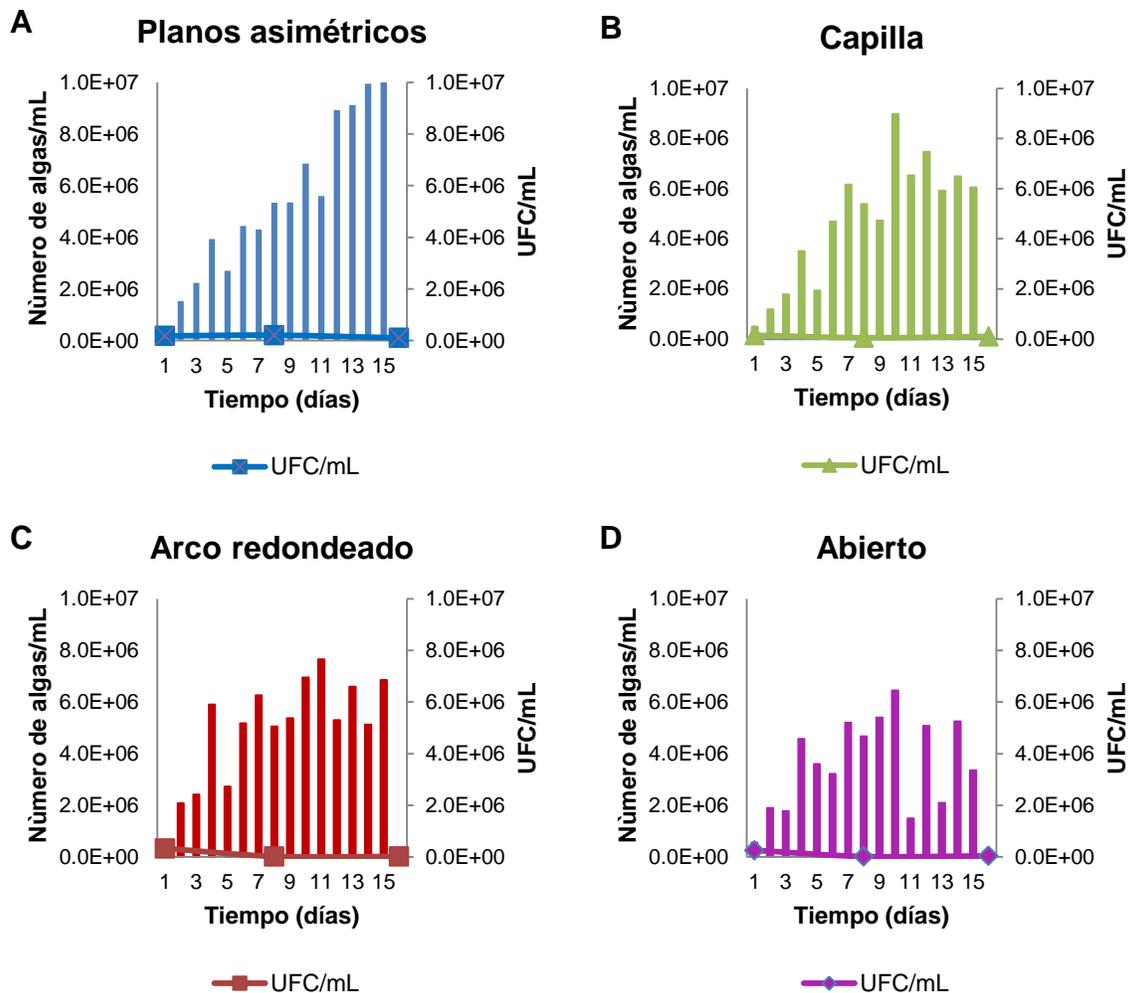
**Tabla 10.** Comparación de la productividad lipídica obtenida en otros estudios.

Referencias	Cepa	Productividad lipídica (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Tipo de sistema	Volumen
(Arumugam <i>et al.</i> , 2011)	<i>Chlorococcum humicola</i>	7	Estanques abiertos	---
(Jena <i>et al.</i> 2012)	<i>Chlorococcum sp.</i>	12.44	Matraz	250 mL
(Harwati <i>et al.</i> , 2012)	<i>Chlorococcum sp.</i>	90.8	Matraz Erlenmeyer	300 mL
El presente trabajo	<i>Chlorococcum humicola</i>	150	Raceways semicerrado	10 L

**6.2.2.5. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la contaminación de los sistemas**

Con sistemas semicerrados se tienen ventajas como las que ofrecen los fotobiorreactores, proporcionando un mejor control de la intensidad de luz, temperatura y mayor relación de área-volumen (Dragone, G., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A., 2010). Mejorando la producción comercial de biomasa microalgal y reduciendo la posibilidad de contaminación bacteriana.

En todas las geometrías (planos asimétricos (a), capilla (b), arco redondeado (c) y abierto (d)), el número de algas resultó ser hasta 90% mayor que la contaminación (UFC/mL).



**Figura 27.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la contaminación del cultivo de *Chlorococcum humicola*.

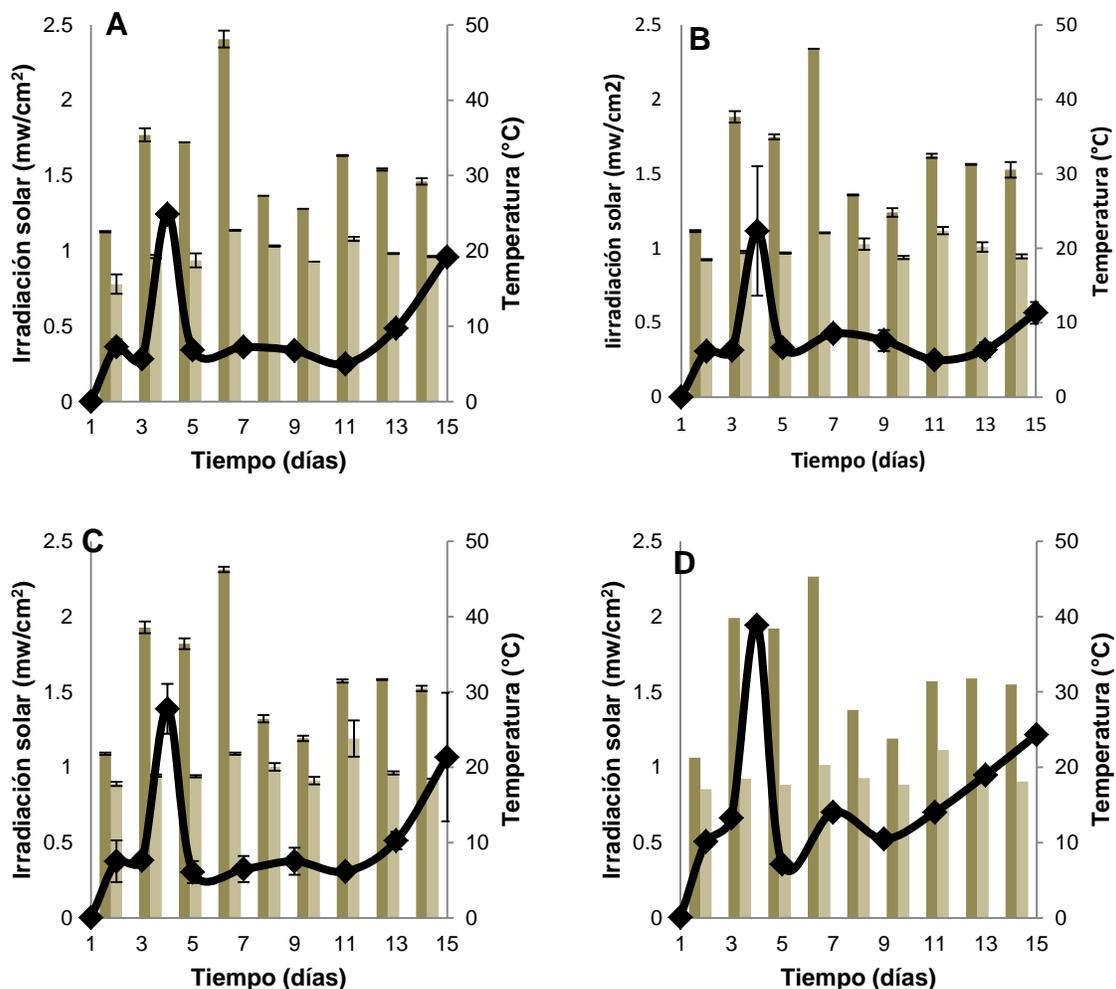
### 6.2.3. Sistemas semicerrados con material rígido

#### 6.2.3.1. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar, temperatura en el interior de las cubiertas y del cultivo

En los sistemas semicerrados la irradiación solar recibida fue de 45 a 60% menor a la de los sistemas abiertos, sin embargo, no fue estadísticamente significativo ( $p \geq 0.05$ ), de acuerdo con los resultados obtenidos por el estudio de comparación de medias.

Para todos los sistemas (abierto y semicerrados) la irradiación solar alcanzó hasta  $15 \text{ W/m}^2$  (Figura 28). De acuerdo con lo reportado por Kim *et al.* (2002) esta intensidad de luz se encuentra dentro del rango típico de saturación de luz para las algas, el cual es de aproximadamente de  $14$  a  $42 \text{ W/m}^2$ .

En promedio, la temperatura al interior de las cubiertas y la temperatura al exterior fue de aproximadamente  $32^\circ\text{C}$ . Así mismo, la temperatura del medio de cultivo fue de  $20^\circ\text{C}$  para todos los sistemas (semicerrados y el abierto) (Figura 28).



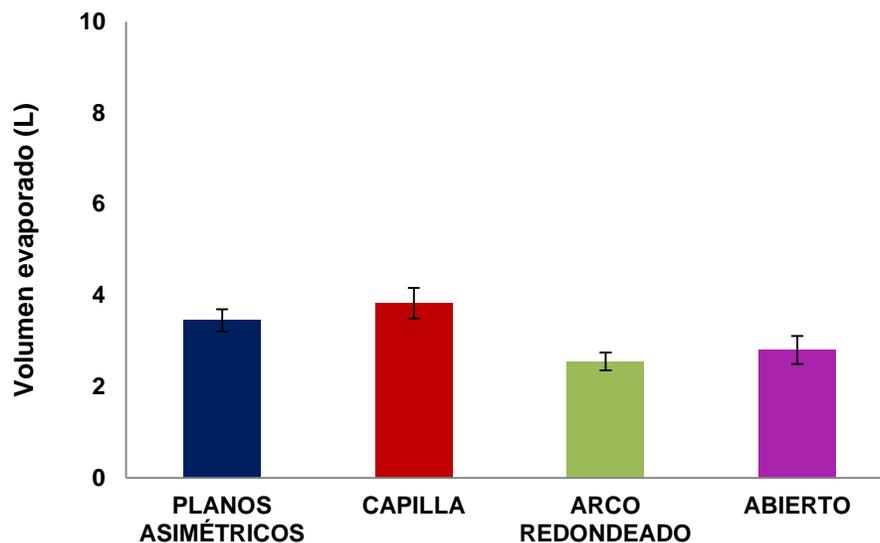
**Figura 28.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la irradiación solar (—◆—), temperatura en el interior de la cubierta (■), temperatura del cultivo (■), y las geometrías de cubierta: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y sistema abierto (control) (D).

### 6.2.3.2. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la pérdida de agua por evaporación

La fuerte precipitación pluvial en el período de este experimento (Agosto), provocó que durante ciertos días se tuviera un efecto importante en el volumen de operación de los raceways abierto y semicerrados. Para todos los sistemas la pérdida de agua por evaporación fue hasta 60% menor, en relación al experimento 1 y 2.

En el raceway abierto, el volumen perdido fue de 500mL hasta el día 6 de operación de los raceways y en los días posteriores el volumen perdido, fue de 0mL, debido a que fue restituido automáticamente por el agua pluvial. En promedio, el volumen perdido para este sistema fue de  $230 \pm 0.30$  mL (Figura 29).

Con la cubierta arco redondeado, se obtuvo una reducción del volumen perdido de agua del 10 a 15%, respecto a las otras dos geometrías, el volumen perdido por día fue de  $200 \pm 0.19$  mL (Figura 29).



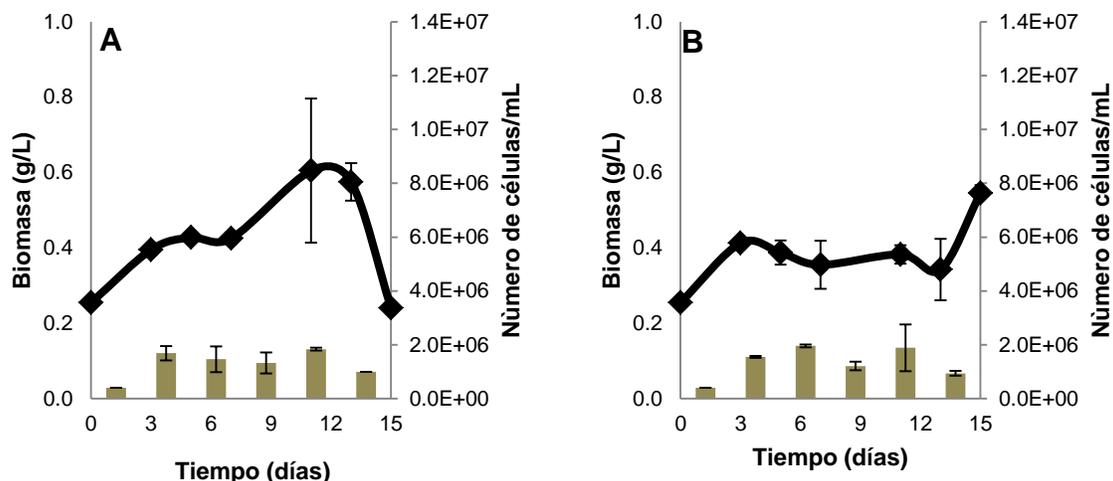
**Figura 29.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la pérdida de agua por evaporación durante el cultivo de *Chlorococcum humicola*.

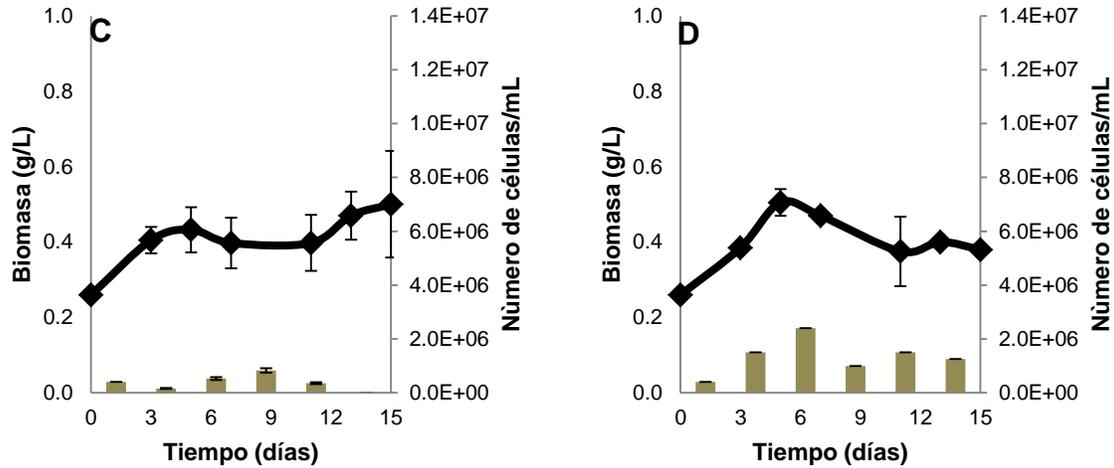
### 6.2.3.3. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la producción de biomasa

El efecto del tipo de sistema (abierto y semicerrado) y geometrías de cubierta en la cantidad de biomasa no fue significativo ( $p \geq 0.05$ ) durante los 15 días de operación de los raceways de acuerdo con los resultados obtenidos por el estudio de comparación de medias. Para todos los raceways el número de células fue de  $4 \times 10^5$  células/mL a  $1.25 \times 10^5$  células/mL (Figura 30).

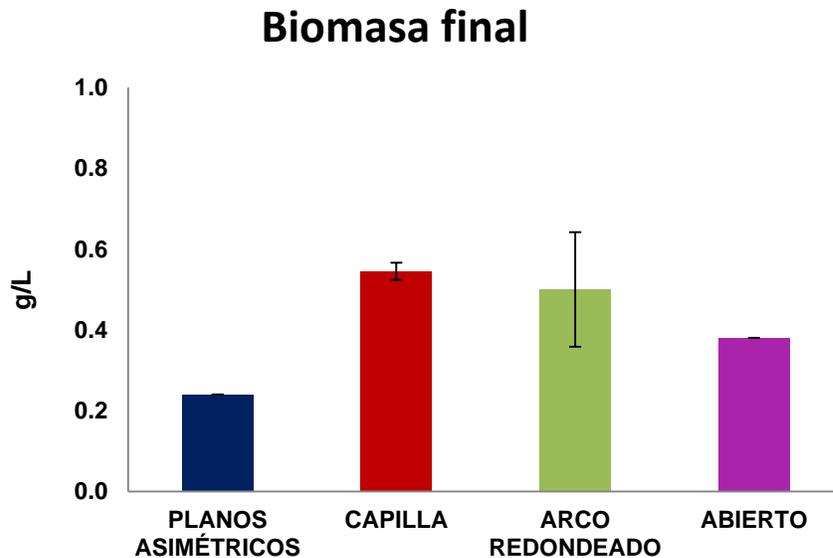
En los sistemas abiertos y los sistemas semicerrados con cubierta arco redondeado, la velocidad de crecimiento fueron las mayores ( $0.230 \text{ d}^{-1}$ ) (Tabla 11). Sin embargo, esta velocidad de crecimiento es más lenta a lo reportado por (Mahapatra & Ramachandra, 2013), quienes cultivaron *Chlorococcum sp.* en fotobiorreactores de 1 L durante 10 días con agua residual artificial, obteniendo una velocidad de crecimiento,  $0.750 \text{ d}^{-1}$ .

En los raceways con cubierta en capilla, se obtuvo la mayor cantidad de biomasa ( $0.545 \text{ g L}^{-1}$ ) al final de la cinética, 40% mayor que en los otros sistemas (Figura 31). Sin embargo, este valor es menor que lo reportado por (Mahapatra & Ramachandra, 2013), quienes cultivaron *Chlorococcum sp.* en fotobiorreactores de 1 L y obtuvieron una cantidad de biomasa final de  $0.9 \text{ g L}^{-1}$ .





**Figura 30.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la concentración de biomasa (—◆—), número de células (■) y las tres geometrías de cubierta evaluadas: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y el control (D).



**Figura 31.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta, en la cantidad biomasa al final del cultivo de *Chlorococcum humicola*.

**Tabla 11.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en el crecimiento de *Chlorococcum humicola*.

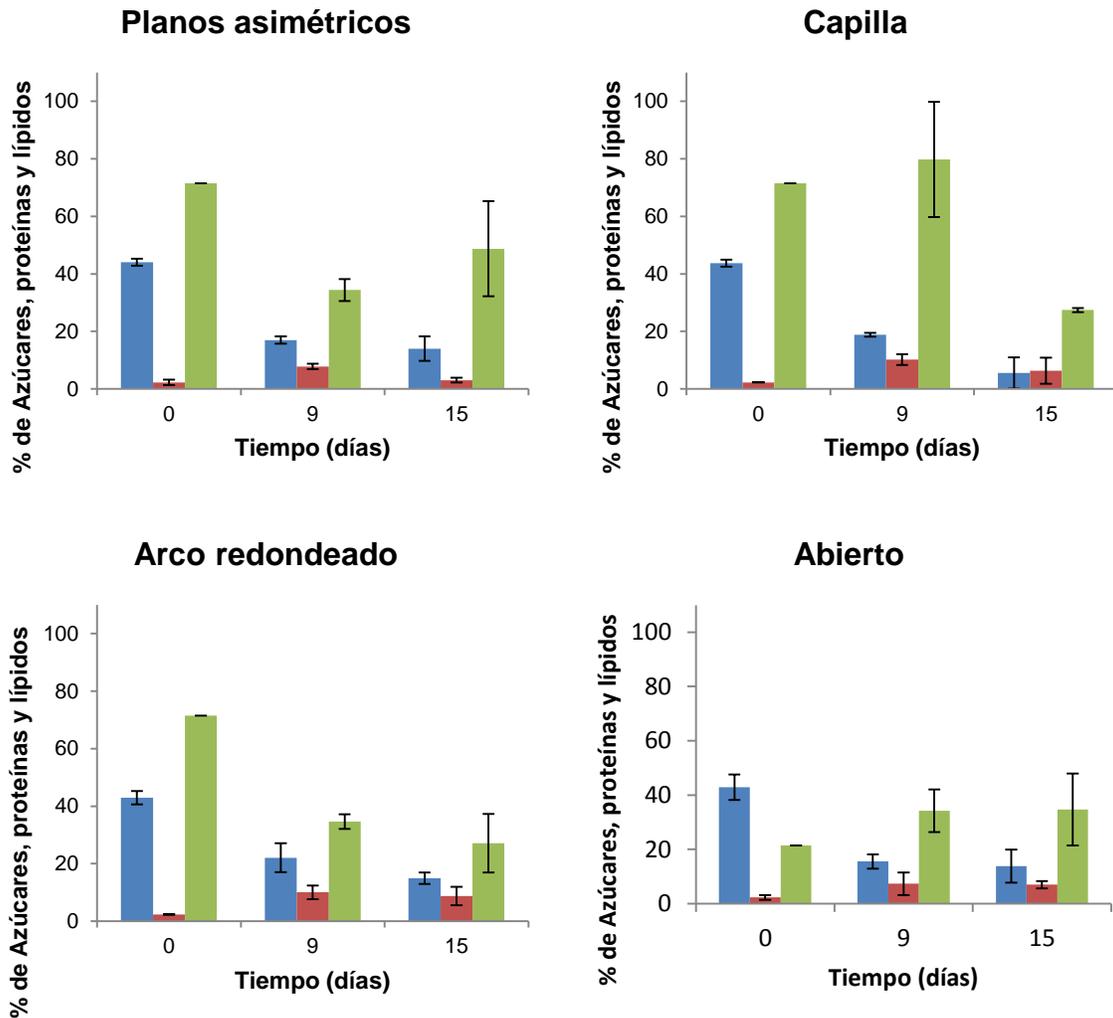
	Planos asimétricos	Capilla	Arco redondeado	Control (abierto)
Velocidad de crecimiento, $\mu$ , ( $d^{-1}$ )	0.183	0.170	0.228	0.228
Tiempo de duplicación, $T_d$ ( $d^{-1}$ )	3.782	4.563	3.041	3.041
Productividad de biomasa ( $g L^{-1} d^{-1}$ )	0.038	0.036	0.033	0.025

**6.2.3.4. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la cantidad de carbohidratos, proteínas y lípidos**

Para todos los sistemas (abierto y semicerrados), los azúcares totales disminuyeron de un 40% hasta 5% al final del experimento, el contenido de proteínas no fue mayor al 10 % (0.07 mg/mL) y el máximo contenido de lípidos fue de 158 g/L.

El contenido de azúcares, proteínas y lípidos obtenidos del cultivo de *Chlorococcum humicola* durante los 15 días de operación de los raceways. En el caso de planos asimétricos, la cantidad total de lípidos disminuyó del 70% al 50%, a los 9 días posteriores a la inoculación de los raceways, el contenido de carbohidratos fue de 45% al 15%, al final del experimento y el contenido de proteínas que se obtuvo se mantuvo en 3%, durante toda la cinética. Para el caso de capilla el contenido de lípidos disminuyó del 70% al 30% desde el día 9 hasta el final del experimento, la cantidad de carbohidratos fue del 45% al 5%, al final del experimento y el contenido de proteínas que se obtuvo no fue mayor al 10%. Para el caso de arco redondeado y el sistema abierto, el contenido de lípidos disminuyó

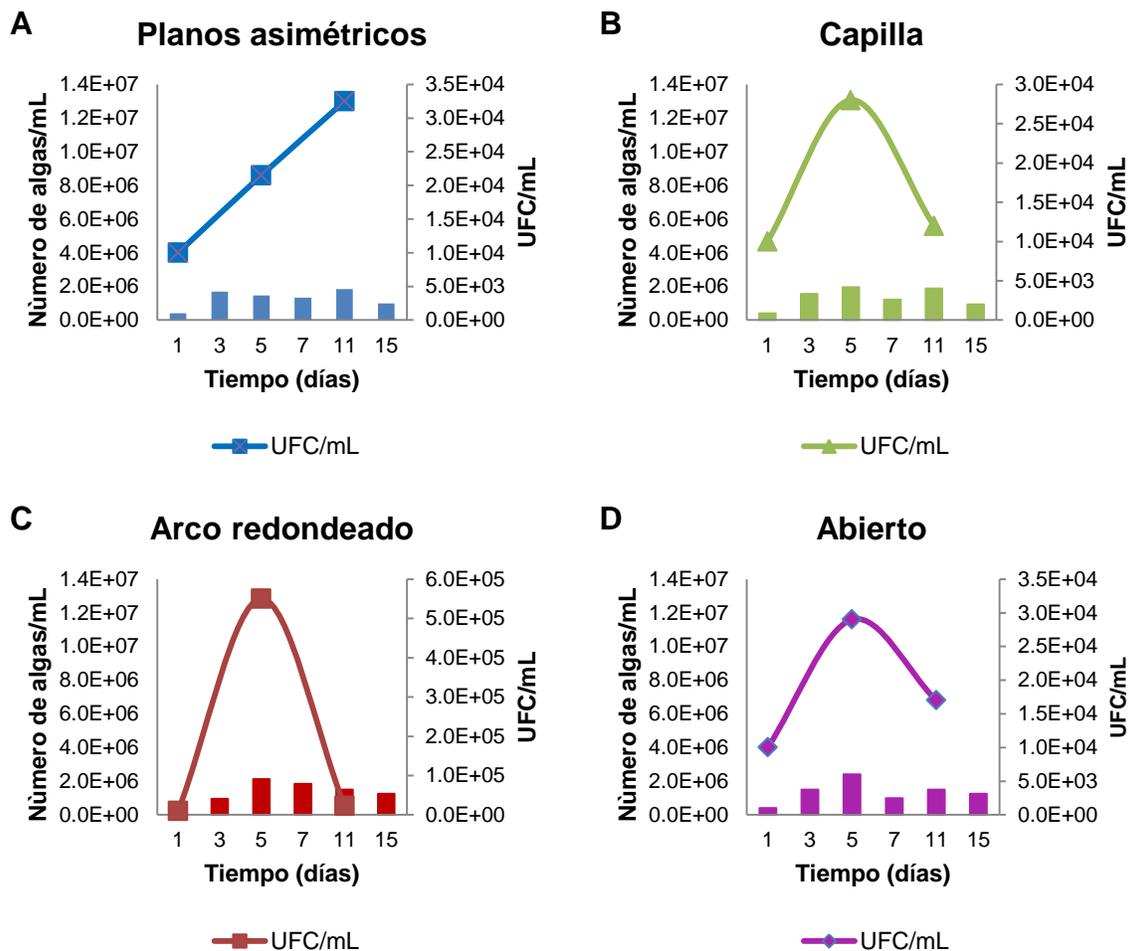
hasta obtener 35% de lípidos totales, la cantidad de carbohidratos fue del 45% al 15% y el contenido de proteínas que se obtuvo no fue mayor al 8%.



**Figura 32.** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubierta en el contenido de carbohidratos (■), proteínas (■) y lípidos (■) de *Chlorococcum humicola*.

### 6.2.3.5. Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de cubierta en la contaminación de los sistemas

En los raceways abiertos, la contaminación bacteriana fue hasta 90% mayor que en los sistemas semicerrados. Sin embargo, en todos los raceways el número de bacterias aumentó igual al número de algas, los cuales no fueron mayores a  $2 \times 10^6$  (Figura 33). Este comportamiento fue igual si se compara con reportado por (Lakaniemi, Intihar, & Puhakka, 2012), en el cual utilizan *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactores de 7 L, los cuales fueron operados bajo condiciones no axénicas, reportando que el número de bacterias aumentó al igual que el número de algas.



**Figura 33** Efecto del tipo de sistema y de las geometrías de las cubiertas en la contaminación del cultivo de *Chlorococcum humicola*.

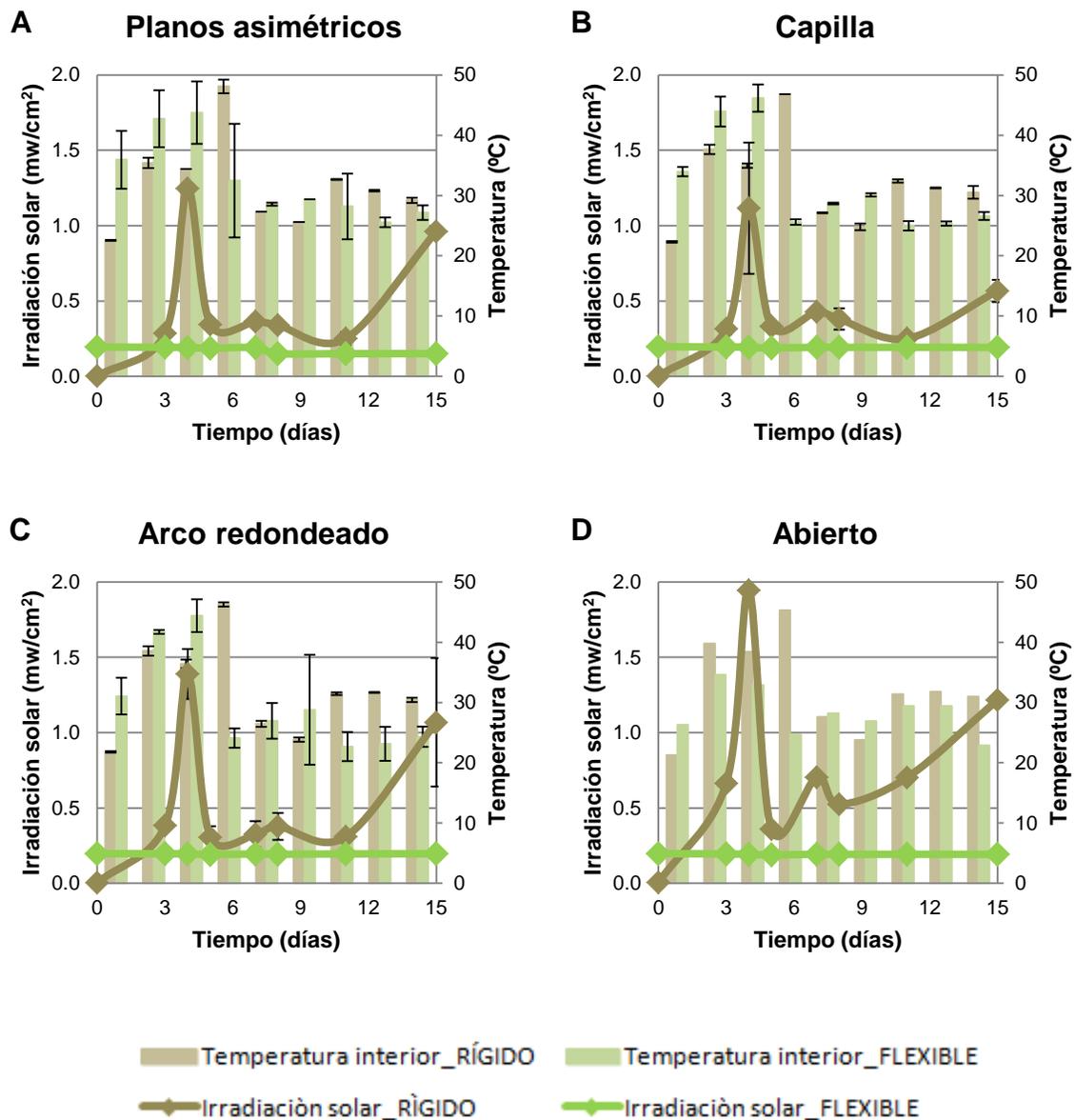
### **6.3. Efecto del material de cubierta**

El efecto del material de cubierta en los parámetros de irradiación solar, temperatura en el interior de las cubiertas, pérdida de agua por evaporación, biomasa, contenido de carbohidratos, proteínas, lípidos y contaminación bacteriana, se determinó estableciendo un análisis estadístico de comparación de media (anova múltiple). Debido a que los resultados fueron mejores en el experimento 1, se compararon los datos de esta prueba con los datos del material rígido.

#### ***6.3.1. Efecto del material de cubierta en la irradiación solar y temperatura en el interior de las cubiertas***

De acuerdo con los resultados del análisis de comparación de media (anova múltiple), se obtuvo un efecto significativo por el material de cubierta en la irradiación solar recibida. Con el material flexible tricapa la irradiación solar recibida fue hasta 50% menor que con el material rígido (Figura 34). Este comportamiento es igual si se compara con lo reportado por (M. J. Gupta & Chandra, 2002), quienes usaron un material de cubierta tricapa y obtuvieron una reducción del 45 a 75% en la irradiación solar recibida. Este resultado indica que con los raceways con material flexible se tendrá menor irradiación solar que con el material rígido.

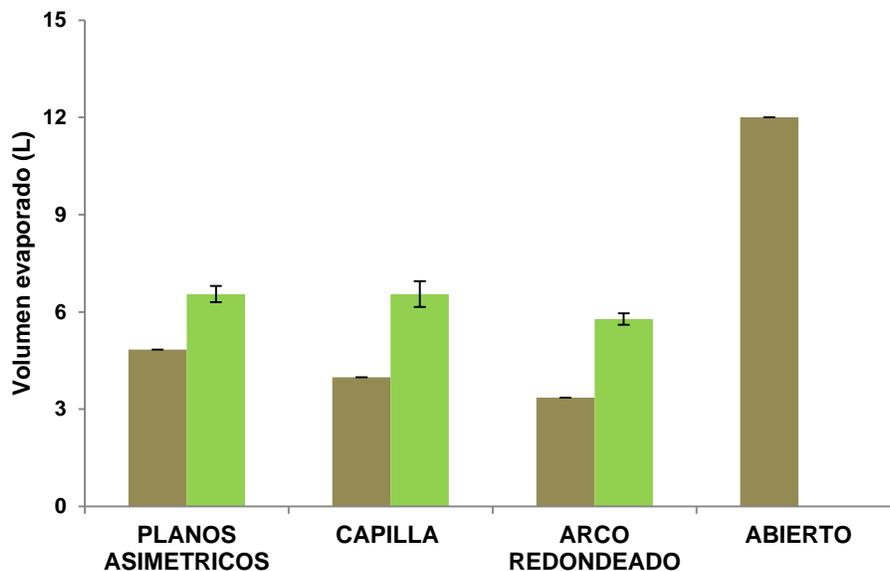
Con ambos materiales, para todos los sistemas, el promedio de la temperatura en el interior de las cubiertas, la temperatura al exterior y la temperatura del medio de cultivo fue aproximadamente de 30 a 35°C (Figura 34). Esto indica que los dos materiales de cubierta propuestos fueron eficaces para mantener una temperatura óptima en el crecimiento de microalgas. Particularmente, el no controlar la temperatura, reduce el crecimiento y composición de carbohidratos, proteínas y lípidos.



**Figura 34.** Efecto del tipo de material y las geometrías de cubierta en la irradiación solar, (—◆—); temperatura en el interior de la cubierta, (—■—) y temperatura del cultivo, (—■—), planos asimétricos, (A); capilla, (B); arco redondeado, (C) y sistema abierto (control), (D).

### 6.3.2. Efecto del material de cubierta en la pérdida de cultivo por evaporación

Se obtuvo un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) por el material de cubierta en la pérdida de cultivo por evaporación. Con el material flexible de cubierta la pérdida de cultivo por evaporación fue hasta 50% mayor a comparación del material rígido (Figura 35). Este comportamiento puede deberse principalmente a las propiedades adicionales del material flexible, en específico al efecto termoaislante, el cual permite mantener la temperatura en el interior de las cubiertas. De esta manera, el material rígido de cubierta es mejor para evitar pérdidas del medio por evaporación en los raceways.

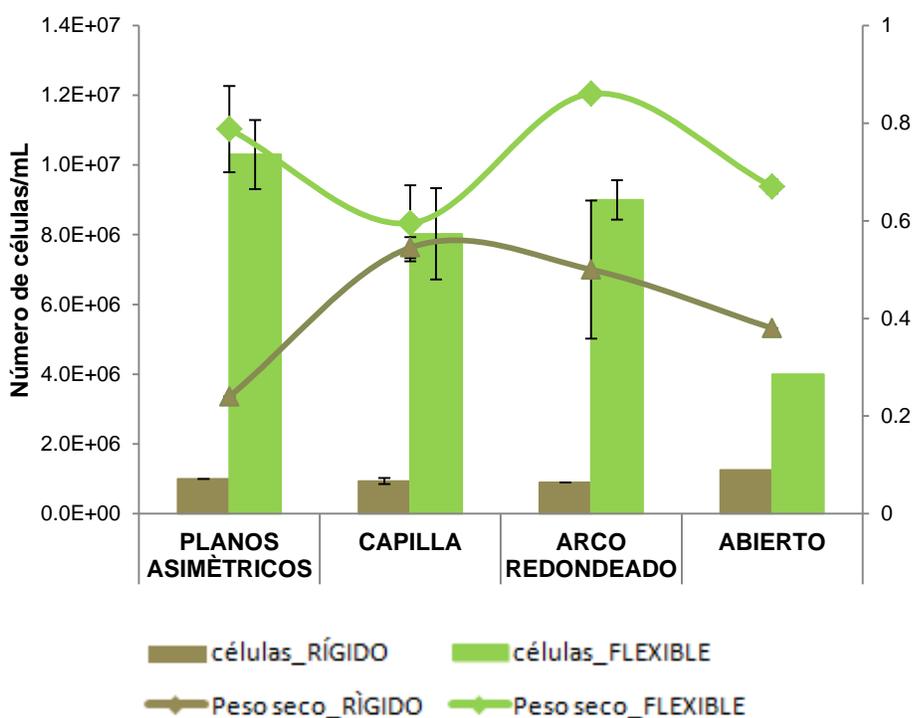


**Figura 35.** Efecto del material de cubierta, en la pérdida de agua por evaporación durante el cultivo de *Chlorococcum humicola*. Material rígido (izquierda) y material flexible (derecha).

### 6.3.3. Efecto del material de cubierta en el rendimiento de biomasa

Se obtuvo un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) por el material de cubierta en la cantidad de biomasa. En los sistemas con material flexible el número de células al final de la cinética fue 50% mayor que en los sistemas con material rígido (Figura 36).

La biomasa al final de la cinética fue hasta 40% mayor en raceways con cubiertas planos asimétrico y capilla con material flexible, si se compara con el material rígido. Con la cubierta capilla con material flexible la biomasa al final fue 10% mayor que con el material rígido. De esta manera, con el material flexible de cubierta fue mejor el crecimiento de *Chlorococcum humicola* en raceways de 8 L.



**Figura 36.** Efecto del tipo de material en el peso seco (—▲—) y el número de algas/mL (■), y las tres geometrías de cubierta evaluadas: planos asimétricos (A), capilla (B), arco redondeado (C) y el control (D), al final de la cinética de *Chlorococcum humicola*.

#### **6.3.4. Efecto del material de cubierta en el contenido de carbohidratos proteínas y lípidos**

No hubo una diferencia significativa  $p \geq 0.05$  por los materiales de cubierta utilizados, en el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos. Esto solo indica que el material flexible y el rígido de cubierta son útiles para el cultivo de microalgas y no para incrementar el porcentaje lipídico, de azúcares y proteínas.

#### **6.3.5. Efecto del material de cubierta en la contaminación de los sistemas**

No hubo una diferencia significativa  $p \geq 0.05$  por los materiales de cubierta utilizados, en la contaminación de los sistemas, lo cual indica que la reducción de la contaminación no depende del material de cubierta.

## **7. Conclusiones**

- En la selección de la cepa se consideró la cepa que presentaba mejor desempeño en la producción de biomasa en un fotobiorreactor esta fue la de *Chlorococcum humicola*.
- Los raceways semicerrados permitieron que hubiera una mayor irradiación solar y propiciaron una temperatura adecuada para el crecimiento de *Chlorococcum humicola*, respecto de los raceways abiertos.
- Los raceways semicerrados favorecieron las condiciones óptimas de temperatura (20 a 30°C) para el crecimiento de *Chlorococcum humicola*, con lo que respecta al sistema abierto la temperatura fue 30% menor.
- Con los sistemas semicerrados, las pérdidas del volumen por evaporación fueron hasta 50% menores respecto a los sistemas abiertos.

- La contaminación en el cultivo de microalgas fue 60 % mayor en los sistemas abiertos que los semicerrados.
- Con los raceways semicerrados se obtuvo un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) por el tipo de material, en la irradiación, temperatura en el interior de las cubiertas, y en las pérdidas del cultivo por evaporación
- El tipo de geometría de cubierta no fue significativo ( $p \geq 0.05$ ) en la producción de biomasa, contenido celular de carbohidratos, proteínas y lípidos.
- Con el material flexible la irradiación solar fue 50% menor que con el material rígido. Los dos materiales de cubierta propuestos fueron eficaces para mantener una temperatura óptima en el crecimiento de microalgas, la cual fue de 20 a 30°C. La pérdida de agua por evaporación fue 50% mayor con el material flexible, si se compara con el material rígido.
- En los sistemas semicerrados con material flexible el número de células de *Chlorococcum humicola* al finalizar la cinética fue 50% mayor que en los sistemas con material rígido.

### 6.1. Conclusión genera

- Para el adecuado crecimiento de la *Chlorococcum humicola* de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo los raceways semicerrados de material flexible son una alternativa ya que permiten la disminución en la pérdida de agua por evaporación y propician las condiciones de crecimiento necesarias para esta microalga.

## 8. Referencias

- Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M. C., & Ahmed, Z. (2011). Microalgae: a renewable source for second generation biofuels. *Current Science*, 100(8), 1141-1142.
- Balat M., Balat H. (2010). Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*. 87, 1815–1835.
- Boylestad, R. L. (2009). *Teoría de Circuitos y Dispositivos Electrónicos*.
- Budny,D., Sotero, P. (2007). Brazil Institute special report: The Global dynamics of biofuels.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72, 248-254.
- Cassidy, K. O. (2011). *EVALUATING ALGAL GROWTH AT DIFFERENT TEMPERATURES*. (Master), University of Kentucky, [http://uknowledge.uky.edu/bae\\_etds/3](http://uknowledge.uky.edu/bae_etds/3).
- Chen, P., Min, M., Chen, Y., Wang, L., Li, Y., Chen, Q., ... & Ruan, R. (2010). Review of biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2(4), 1-30.
- Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advance*.25, 294-306.
- Craggs, R.J.; Tanner, C.C.; Sukias, J.P. & Davies-Colley, R.J. (2000) 'Advanced Pond Systems:Performance under New Zealand conditions', NZWWA 2000 Annual Conference, 19 - 23 March 2000.

- Davies-Colley, R.J. (2005) 'Pond disinfections. Pond Treatment Technology', Ed. By A. Shilton London, IWA Publishing 1, 100-136.
- Dayananda, C., Sarada, R., Rani, M. U., Shamala, T. R., & Ravishankar, G. A. (2007). Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass and Bioenergy*, 31, 87-93.
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49(2008), 2106–2116.
- Demirbas A. (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Convers Manage*.50: 14–34.
- Demirbas A., Demirbas M. F. (2010). Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*.52, 163–170.
- Doucha, J., & Lívanský, K. (2006). Productivity, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *Journal of Applied Phycology*, 18(6), 811-826.
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2010). Third generation biofuels from microalgae.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem*. 28, 350-356.
- Fuller, R.J., 2007. Solar heating systems for recirculation aquaculture. *Aquacultural Engineering* 36, 250–260.
- Fuerst, J. A. (2010). Beyond prokaryotes and eukaryotes: planctomycetes and cell organization. *Nat. Educ*, 3, 44.

- Garibay A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología*13, 38-66.
- Garibay, A. (2008). *EVALUACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS CON EL ALGA Neochloris oleoabundans PARA SU USO POTENCIAL COMO BODIESEL*. (MAESTRO EN CIENCIAS), UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, México.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., & Phillips, G. B. (1981). Manual of methods for general bacteriology.
- Gómez, E.; Casellas, C.; Picot, B. and Bontoux, J. (1995) 'Ammonia limitation Processes in Stabilization and High-rate Algal Pond systems.' *Water Science and Technology* 3 (12), 303-312.
- Gupta, M. J., & Chandra, P. (2001). Effect of greenhouse design parameters on conservation of energy for greenhouse environmental control. *ENERGY*, 27, 777-794.
- Gupta, M. J., & Chandra, P. (2002). Effect of greenhouse design parameters on conservation of energy for greenhouse environmental control. *Energy*, 27, 777-779.
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L., 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21, 493–507.
- Guru M., Artukoglu B. D., Keskin A., Koca A. (2009). Biodiesel production from waste animal fat and improvement of its characteristics by synthesized nickel and magnesium additive. *Energy Convers Manage*. 50, 498–502.
- Hameed B. H., Goh C. S., Chin L. H. (2009). Process optimization for methyl ester production from waste cooking oil using activated carbon supported potassium fluoride. *Fuel Process Technol*. 9, 1532–1537.

- Harwati, T. U., Willke, T., & Vorlop, K. D. (2012). Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp. *Bioresource Technology*, 121, 54-60.
- Hu, Q., Kurano, N., Kawachi, M., Iwasaki, I., & Miyachi, S. (1998). Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(6), 655-662.
- Jahns, Thomas R., and Jeff Smeenk. *Controlling the Greenhouse Environment*. University of Alaska Fairbanks, Cooperative Extension Service, 2009.
- James, S., & Boriah, V. (2010). Modeling Algae Growth in an Open-Channel Raceway. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL BIOLOGY*, 17(7), 895-906.
- Jena, J., Nayak, M., Panda, H. S., N.Pradhan, Sarika, C., Panda, P. K., . . . Sukla, L. B. (2012). Microalgae of Odisha Coast as a Potential Source for Biodiesel Production. *World Environment*, 2(1), 11-16.
- Kim, N. J., Suh, I. S., Hur, B. K., & Lee, C. G. (2002). Simple monodimensional model for linear growth rate of photosynthetic microorganisms in flat-plate photobioreactors. *J. Microbiol. Biotechnol*, 12(6), 962-971.
- Knothe G (2005) Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol*. 86: 1059-1070.
- Kirrolia, A., Bishnoi, N. R., & Singh, R. (2012). Effect of shaking, incubation temperature, salinity and media composition on growth traits of green microalgae *Chlorococcum* sp. *J. Algal Biomass Utilization*, 3(3), 46-53.
- Lakaniemi, A. M., Intihar, V. M., & Puhakka, O. H. T. J. A. (2012). Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors. *Microbial Biotechnology*, 5(1), 69-78.

- Laurens, L. M., & Wolfrum, E. J. (2011). Feasibility of Spectroscopic Characterization of Algal Lipids: Chemometric Correlation of NIR and FTIR Spectra with Exogenous Lipids in Algal Biomass. *Bioenerg. Res.*, 4, 22-35.
- Li, S., Willits, D. H., Browdy, C. L., Timmons, M. B., & Losordo, T. M. (2009). Thermal modeling of greenhouse aquaculture raceway systems. *Aquacultural Engineering*, 41, 1-13.
- Loera M., Olguin E. (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *BioTecnologíaAmb1*, 91-116.
- Mahapatra, D. M., & Ramachandra, T. V. (2013). Algal biofuel: bountiful lipid from *Chlorococcum* sp. proliferating in municipal wastewater. *CURRENT SCIENCE*, 104, 1-9.
- Martin, L., Rodríguez, H., Vargas, M. A., Obratsova, I., Johannsbauer, W., Gutsche, B., . . . weiss, A. (2007). EUROPEAN PATENT APPLICATION.
- Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sustain Energy*. 14, 217–232.
- Miao X., Wu Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour Techno*. 97, 841-846.
- Miller, T. S., Tompkins County (N.Y.) Dept. of Planning, & U.S. Department of the Interior (Cartographer). (2000). Unconsolidated aquifers in Tompkins County, New York [Map; Computer File]. Retrieved from <http://purl.access.gpo.gov/GPO/LPS17328>
- Moheimani NR, Borowitzka MA (2006) The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. *J Appl Phycol* 18, 703–712

- Mutanda T., Bux F., Ramesh D., Karthikeyan S., Kumari S., Anandraj A. (2010). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Techn.* 102, 57–70.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2009). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2010), 578–597.
- Ortega, A. A., & Reyes, H. (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.
- Ozkan, A., Kinney, K., Katz, L., & Berberoglu, H. (2012). Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor. *Bioresource Technology*, 114, 542-548.
- Ríos, N., Medina, G., & Jiménez, J. (2009). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. *Rev. peru biol*, 16(1), 97-100.
- Robles-Medina A., Molina-Grima E. González-Moreno P. A., Esteban-Cerdán L. (2009). Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechn Advances*. 27, 398–408.
- Ramirez, J., & Torres, E. (2006). Generación limpia de energía eléctrica. *CINVESTAV*.
- Rhee, G. Y. (1972). Competition between an alga and an aquatic bacterium for phosphate. *Limnol. Oceanogr*, 17(4), 505-514.
- Richardson, J. W., Outlaw, J. L., & Allison, M. (2010). The economics of microalgae oil.
- Richmond, A. (Ed.). (2008). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. John Wiley & Sons.

- Rojas, A., Girón, E., & Torres, H. (2009). Operations variables in the transesterification process of vegetable oil: a review -chemical catalysis. *Ingeniería e investigación*, 29(3), 17-22.
- Rosales, N., Loreto, C., Bermúdez, J. and Morales, E. (2004). Intermediate renewal rates enhance the productivity of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. in semicontinuous cultures. *Cryptogamie: Algol.*, 25(2): 207–216.
- Ruiz, A. (2011). *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente*. (49), Universidad politècnica de Valencia, Valencia. (2008)
- Salazar Pérez, L. E. (2012). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para producción de biodiesel.
- SENER (2006). Prospectiva del sector eléctrico. 2006-2015.
- Serraro, L. (2012). *Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel*. (Magister en Ingeniería Química), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Sethi V. (2008). On the selection of shape and orientation of a greenhouse:
- Sethi, V.P., Sharma, S.K., 2007a. Thermal modeling of a greenhouse integrated to an aquifer coupled cavity flow heat exchanger system. *Sol. Energ.* 81 (6), 723–741.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussnug, J. H., Posten, C., ... & Hankamer, B. (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 1(1), 20-43.

- Singh, A., Nigam, P. S., & Murphy, J. D. (2011). Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels. *Bioresource technology*, 102(1), 26-34.
- Singh, L. P., Gill, S. S., & Tuteja, N. (2011). Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 175-191.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., 1998. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. Tech. Rep. NREL/TP-580-24190, National Renewable Energy Laboratory.
- Sivasubramanian, V., In International Conference on Algal Biomass, Resources and Utilization, Chennai, 27–30 July 2009.
- Toledo, A. (2010). *Captura de CO2 por una comunidad de microalgas obtenidas de un ecosistema natural mexicano*. (Maestría), Universidad autónoma metropolitana.
- Valenzuela, E. E., Cruz, F. L. D. I., Millan, N. R., & Núñez, C. F. (2005). Growth, nutrient uptake and proximate composition of *Rhodomonas* sp. cultured using f/2 medium and agricultural fertilizers. *Ciencias Marinas*, 31(1A), 79-89.
- Vera A., Martínez M., Morillo K. & Montes S. 2006. Cultivo discontinuo de *Chlorella* sp. en medios enriquecidos con el exudado gomoso de *Acacia macracantha*. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, 38 (2), 109-11.
- Wen Z., Johnson M. B. (2009). Microalgae as a feedstock for biofuel production. *Communications and marketing, Publication*. 442-886.
- Zamir, N., Medan, G., Arbel, A., & Levav, N. (1983, August). The influence of climatic conditions on the heat losses from conventional and sloping

greenhouses. In *III International Symposium on Energy in Protected Cultivation* 148. 319-328.

Agricultural plastics and meshes

[http://www.infoagro.com/industria\\_auxiliar/plasticos.htm](http://www.infoagro.com/industria_auxiliar/plasticos.htm) Consultado 21-06-13.

Reporte Climatológico de la Comisión Nacional de Agua, Julio 2012, Año 2 Número 7.

<http://smn.cna.gob.mx/climatologia/analisis/reporte/RC-Julio12.pdf> Consultado 30-06-13.

BP Statistical Review of World Energy June 2012.

[www.bp.com/statisticalreview.com](http://www.bp.com/statisticalreview.com). Consultado 07-10-12.

ProMéxico 2012.

[http://www.promexico.gob.mx/es\\_ca/promexico/Energias\\_Renovables](http://www.promexico.gob.mx/es_ca/promexico/Energias_Renovables). Consultado 07-01-13.

Green Star Products Complete Algae Demonstration Report.

<http://www.josephlastella.com/algaereport.html> Consultado 07-08-12.