

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA
LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE
BIOCOMBUSTIBLES”**

Realizado por:

MARÍA SOLEDAD SUBÍA MUÑOZ

Director del proyecto

Ing. MBA. Rodolfo Jefferson Rubio Aguiar

Como requisito para la obtención del título de:

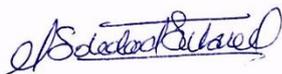
INGENIERA QUÍMICA INDUSTRIAL

Quito, 3 de AGOSTO de 2017

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA
COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, MARÍA SOLEDAD SUBÍA MUÑOZ, con cédula de identidad 171668305-5, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



MARÍA SOLEDAD SUBÍA MUÑOZ

C.C: 171668305-5

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA
LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE
BIOCOMBUSTIBLES.”**

Realizado por:

MARÍA SOLEDAD SUBÍA MUÑOZ

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA QUÍMICA INDUSTRIAL

ha sido dirigido por el profesor

RODOLFO JEFFERSON RUBIO AGUIAR

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



RODOLFO JEFFERSON RUBIO AGUIAR

DIRECTOR

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

PABLO CASTILLEJO

JOHANNA MEDRANO

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



Pablo Castillejo



Johanna Medrano

Quito, 3 de Agosto de 2017

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

DEDICATORIA

A mi familia por todo el apoyo incondicional que me han brindado y quienes han sido una parte fundamental en todo este camino.

A mis amigos por apoyarme en los buenos y malos momentos.

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

AGRADECIMIENTO

A mi familia por todo el amor y esfuerzo.

A mis maestros por impartirme los conocimientos necesarios para poder culminar con éxito esta etapa de mi vida.

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA
COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA
COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

**EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA
COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES**

María Soledad SUBÍA MUÑOZ¹

Rodolfo Jefferson, RUBIO AGUIAR^{1*}

¹ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales Quito,
Ecuador

* AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Ing. MBA Rodolfo Jefferson Rubio Aguiar,

Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito

Ecuador

rodolfo.rubio@uisek.edu.ec

Título corto: EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS PARA LA
PRODUCCION DE BIOCOMBUSTIBLES.

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

RESUMEN

Se determinaron las mejores condiciones experimentales para la producción y evaluación de la biomasa de microalgas provenientes de Limoncocha con el objetivo de comprobar si pueden ser aprovechadas para la obtención de biocombustibles. Adicionalmente se dio seguimiento a diferentes cultivos con el fin de obtener la cinética de crecimiento de las microalgas mediante conteo celular y establecer el rendimiento con el que se producen a escala de laboratorio controlando las diferentes variables que intervienen en dicho proceso. Una vez obtenida la biomasa en los fotobiorreactores se procedió a caracterizar con el fin de conocer su composición y contenido de lípidos y proteínas para saber si estos pueden ser una opción en la generación de biocombustibles de tercera generación. En este trabajo, se presenta la caracterización de lípidos microalgales por los métodos Soxhlet usando una mezcla binaria de cloroformo/metanol como solventes, dando resultados de 16 % de lípidos totales para *Vischeria sp-Scenedesmus sp* y 42% para el consorcio de *Chlorella sp-Monoraphidium Conturtum sp*.

PALABRAS CLAVE: microalgas, biomasa, Limoncocha, lípidos, proteínas, biocombustibles, cinética

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

ABSTRACT

The best experimental conditions were determined for the production and evaluation of microalgae biomass from Limoncocha Lagoon, to prove whether they can be used to obtain biofuels. In addition, different microalgae cultures were monitored in order to obtain microalgae growing kinetics by cellular count and establish their production yield at laboratory scale by controlling different variables that intervene in the process. The biomass obtained in the photo bioreactor were characterized to determine its composition as well as lipids and protein contents, in order to check if these cultures could be an option for the obtainment of third generation biofuels. In this research, lipid characterization of microalgae was determined by Soxhlet method using a chloroform/methanol binary solution as solvent, resulting 16 % of lipids for *Vischeria sp-Scenedesmus sp* and 42 % for *Chlorella sp-Monoraphidium Conturtum sp*, respectively.

KEY WORDS: Microalgae, biomass, Limoncocha, lipids, proteins, biofuels, kinetics

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el área energética enfrenta dos importantes problemas: la reducción de las reservas petroleras y el aumento de la emisión de CO₂ causante del cambio climático. Ambos resultados están relacionados directamente con la utilización de fuentes de energía derivadas de los combustibles fósiles. A partir de la revolución industrial los gases de efecto invernadero provenientes de los procesos industriales subieron drásticamente y solo hasta el siglo XX es cuando la comunidad científica les atribuye las alteraciones producidas en los ecosistemas y en población humana (Ximhai, 2006).

El petróleo, carbón y gas natural han sido las fuentes principales de energía en el mundo representando aproximadamente el 80 % y aún para el año 2030, las fuentes renovables representarán una pequeña porción de la energía global generada. Las proyecciones a futuro para los combustibles derivados del petróleo son cada vez menos prometedoras tomando en cuenta que los yacimientos restantes son más complicados de refinar por ser de crudo pesado y extrepesado, lo cual se refleja directamente en los costos de producción y en la rentabilidad de los mismos (Ximhai, 2006).

En el Ecuador, según estadísticas del Banco Mundial, para el año 2010 el 87,9 % de la energía consumida provino de combustibles derivados del petróleo, tomando una tendencia ascendente para los próximos años (Banco Mundial, 2013). La economía de nuestro país dependen fuertemente de los combustibles fósiles y se sostiene mediante la exportación de crudo y la demanda de sus derivados que supera los 7000 millones de barriles de petróleo según datos del Banco Central del Ecuador en el 2012 y 2013 (Salas, 2015).

La generación de nuevas fuentes de energías alternativas que no estén ligadas a los combustibles fósiles resulta un desafío para la sociedad actual. En este contexto, son

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

imprescindibles fuentes que sean eficientes para lograr competir con el mercado dominante del petróleo y que pueden satisfacer la demanda generada por los consumidores. Como consecuencia, se hace necesario la implementación de estudios, análisis y caracterización de nuevas materias primas y métodos para la obtención de combustibles sustentables que en un futuro puedan reducir drásticamente la dependencia de estas fuentes contaminantes y poco amigables con el medio ambiente (Salas, 2015).

Biocombustibles

A partir del año 2008, la generalidad sobre los biocombustibles comenzó a tomar fuerza debido al aumento en los precios de los alimentos y los combustibles habituales derivados del petróleo los cuales generan impactos ambientales y un deterioro de los ecosistemas. Si bien es cierto este concepto y la idea de optar por este tipo de combustibles hoy en día es más fuerte, la investigación tanto como la producción de los mismos ha estado presente desde el siglo XIX (Cotidiano, 2009).

Gobiernos como el de Estados Unidos y países europeos han enfatizado la necesidad de la generación de energía a partir de biocombustibles como una fuente alternativa al uso de combustibles fósiles. La propuesta de sustituir en un 20 % el consumo de energía tradicional por la implementación de combustibles de segunda y tercera generación ha sido pronunciada por países como Estados Unidos con el fin de comenzar una transición hacia las energías “verdes”. Sin embargo, con esto se agudizó la competencia entre la utilización de estas materias primas en la producción de alimentos o de biocombustibles, pues estos se pueden generar de los propios alimentos como el maíz, la caña de azúcar, soya entre otros con el consiguiente incremento de precios de estos alimentos básicos (Cotidiano, 2009).

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Los biocombustibles de primera generación comprenden fuentes o materias primas de origen agrícola, las cuales contienen un alto contenido de almidón, azúcares y aceites.

Algunas

de estas materias primas son la palma, soya, coco o semillas de girasol. Adicionalmente se emplean de igual manera insumos de grasas animales derivados de la cocción o elaboración de sólidos orgánicos (Maciel, 2009)

Materias primas agrícolas y forestales como la celulosa son fuentes en la producción de biocombustibles de segunda generación entre ellos el bagazo de la caña de azúcar, trigo, aserrín y hojas son ejemplos de materias primas de dichos combustibles. Los procesos que intervienen en la producción tienen un nivel más alto de complejidad que los citados anteriormente y con estos se logran producir etanol, metanol, gas de síntesis, biodiesel etc., que entre su ventaja principal se encuentra la reducción de materias primas destinadas principalmente al sector alimenticio (Maciel, 2009)

Finalmente los combustibles de tercera generación son obtenidos a partir de materias primas no destinadas a la alimentación, son de crecimiento rápido y dentro de su composición contienen biomoléculas de alta densidad energética denominados así “cultivos energéticos”. Entre estas materias primas se encuentran los pastos perennes, árboles y algas verdes (Maciel, 2009). La gran esperanza se enfoca en los estudios que apuntan a esta clase de biocombustibles usando la biomasa producida por estos microorganismos fotosintéticos autótrofos o heterótrofos como son las microalgas, tomando en cuenta que facilitan el control de las emisiones de CO₂ mediante la absorción y biofijación de cantidades significativas de este gas de efecto invernadero durante su producción y cultivo (Grunewald, 2011).

Se basan en las propiedades de sus materias primas y los procesos tecnológicos empleados para su obtención. La materia prima de estos combustibles son las microalgas, la

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

cuales apuntan a la generación de una gran cantidad de biodiesel por unidad de área gracias a su contenido de grasas el cual es mayor que muchas fuentes actuales y no compiten por el terreno con cultivos de interés agronómico. (Gonz, Kafarov, & Guzm, 2009).

Tomando en cuenta que en el Ecuador se espera implementar políticas y estrategias para el cambio de la matriz productiva, se estima que los biocombustibles aporten cada vez más en la generación de energía para el sector de transporte urbano. En nuestro país no solamente hay una demanda no satisfecha en el área energética, sino que también existe un gran desconocimiento sobre la generación de combustibles empleado materias primas como las microalgas por lo que dichos estudios aportaran significativamente en el complejo proceso de implementar soluciones y alternativas al uso de energías provenientes del petróleo como apuestas sostenibles a mediano y largo plazo (Andrade, 2013).

Con estos antecedentes la idea de la implementación de microalgas con el objetivo de la generación de energía ha surgido con más fuerza en los últimos años; su uso no solamente implica ventajas energéticas, de igual manera contribuyen al control del efecto invernadero y lluvia ácida por ser fijadores de CO₂ y nitrógeno. En estudios recientes se ha extendido la idea de usar la biomasa de estos microorganismos para la obtención de nuevas fuentes alternativas y sustentables de biocombustibles, proponiendo una solución a varios problemas relacionados al uso de combustibles derivados del petróleo (AST ingeniería S. L., 2013)

Por otra parte, la búsqueda de fuentes energéticas que no demanden grandes cantidades de tierra y propongan el uso más eficiente del recurso hídrico ha puesto en plano principal a los aceites de microalgas. Adicionalmente estos microorganismos tienen la capacidad de convertir de forma eficiente el CO₂, uno de los principales gases de efecto invernadero, junto con la luz solar en biomasa y aceites que no compiten con las semillas oleaginosas por la seguridad alimentaria para la población. Existen varios estudios que

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

proponen que el uso de biomasa de microalgas producirá aproximadamente 10 veces más biodiesel por unidad de superficie que las fuentes actuales (Daniela et al., 2015).

Microalgas

Las microalgas son organismos autótrofos unicelulares, coloniales, filamentosos que pueden habitar en numerosos medios acuáticos y ecosistemas dentro del planeta Tierra. Presentan pigmentos fotosintéticos que les permiten realizar fotosíntesis oxigénica y son capaces de convertir la energía proveniente de la luz en energía química siendo cuatro veces más eficientes a la de las plantas. Uno de los roles fundamentales de estos microorganismos radica en el hecho de ser los principales productores primarios de la cadena trófica, siendo así pioneros en la formación de la materia orgánica. Tomando en cuenta la diversidad de cepas que existen, su tamaño puede oscilar en rangos de 5 a 50 μm aproximadamente y son los organismos de crecimientos más rápido en la tierra, desarrollándose así en ambientes con pH y temperatura variables (Segoviano & Islas, 2017)

Las microalgas son una fuente importante de biomoléculas y metabolitos que pueden ser aprovechados en un sin número de aplicaciones con el fin de obtener un beneficio económico y generar energías alternativas. Dentro de su composición se encuentran lípidos, proteínas y carbohidratos y su contenido lipídico oscila entre 20 y 50 % en peso seco. (Colorado, Moreno, & Pérez, 2013). La producción de aceites derivados de microalgas es mayor en comparación a otras materias primas de origen vegetal empleadas en la elaboración de biocombustibles, además se necesita una menor superficie que otros cultivos agrícolas destinados al área energética (Ximhai, 2006)

El desarrollo de esta investigación aportará información acerca de las condiciones de cultivo, y la composición y rendimiento de la biomasa de consorcios de microalgas provenientes de Limoncocha para la obtención de biocombustibles. Utilizando

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

fotobiorreactores a escala de laboratorio para su posterior caracterización y su aplicación en la producción de biocombustibles, determinar la cinética de crecimiento de las microalgas mediante conteo celular y densidad óptica, establecer la productividad de biomasa seca en los fotobiorreactores e implementar los métodos de caracterización en la cuantificación de lípidos totales, perfil lipídico y proteínas con el fin de generar soluciones para la disminución de los impactos generados por los combustibles fósiles en los ecosistemas y de esta forma contribuir al mejoramiento de esta problemática.

Se conoce que las moléculas de triésteres de glicerilo pertenecientes a los aceites vegetales y animales, intervienen en el proceso de transesterificación para la producción de biocombustibles. Químicamente, el biodiesel es una mezcla de ésteres de alquilo (metilo, etilo, ...) que contienen largas cadenas de ácidos grasos obtenidos típicamente a partir de recursos biológicos no tóxicos, tales como los aceites vegetales. Es por eso que la biomasa de microorganismos como las microalgas es una apuesta a largo plazo para el desarrollo de energías más limpias al tener en su estructura una cantidad importante de dichas biomoléculas. Por lo tanto se ha planteado la siguiente hipótesis:

La biomasa de consorcios de microalgas provenientes de la Reserva Biológica “Limoncocha” puede ser aprovechada por su contenido de lípidos totales y perfil lipídico para la producción de biocombustibles de tercera generación.

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo de cepas

La reserva de Limoncocha está ubicada a 210 km al este de Quito aproximadamente, en la provincia Shushufindi , parroquia de Limoncocha (Ulloa, 1988).

El origen fluvial característico de la laguna de Limoncocha viene formado a partir de un brazo del río Napo, y su temperatura media anual es de 24,9 °C. Por ser una zona rica en nutrientes como fósforo y nitrógeno, la laguna de Limoncocha alberga una gran cantidad de microorganismos como microalgas y cianobacterias. Y entre los géneros más importantes se encuentran *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Pandorina*, *Pediastrum* para las microalgas y *Microcystis*, *Osillatoria* y *Anabaena* para cianobacterias (Bravo, 2017).

Los puntos de muestreo fueron obtenidos de los afluentes y efluentes (Pishira y Playa Yacu) ya que la unión de estos ríos con la laguna provoca una mayor proliferación de microalgas debido a la cantidad de nutrientes vegetales presentes en el lugar. Existen especies que toleran niveles de luz bajos (Valladares & Niinemets, 2008) y para su identificación se tomaron muestras de una zona profunda de Limoncocha. Los puntos para los muestreos fueron:

1. Punto 1: El Caño;
2. Punto 2: Desembocadura del Pishira;
3. Punto 3: Desembocadura de Playa Yacu;
4. Punto 4: Zona Profunda;
5. Punto 5: Muelle

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES



Figura 1. Puntos de muestreo en la Laguna de Limoncocha

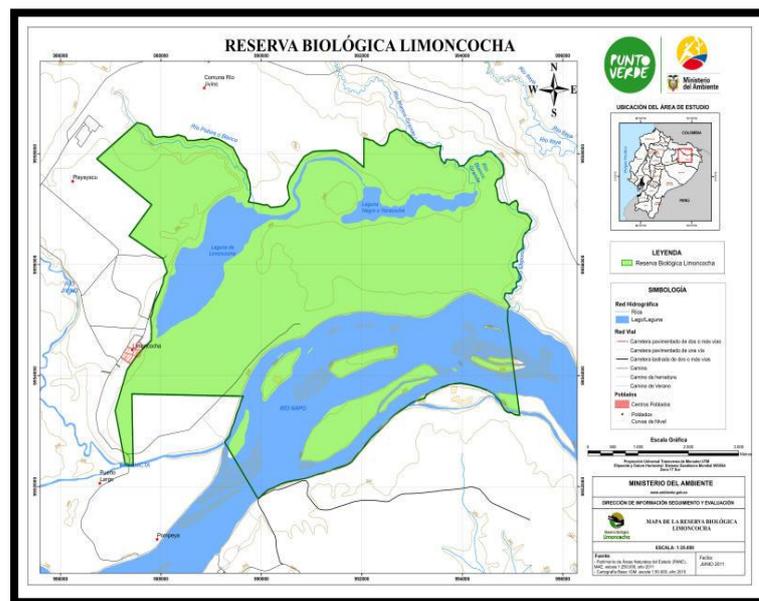


Figura 2 .Mapa de la Reserva Biológica Limoncocha

Fuente: MAE (2011).

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Medio de cultivo

Para la cinética de crecimiento celular se preparó el medio BBM (Bold's Basal Medium)

(Tabla 1) el cual contiene los siguientes stocks para su preparación (Fraunhofer, 2005):

Tabla 1. Soluciones Stock para medio de cultivo BBM líquido

Solución Stock	Componente	Cantidad	Volumen (para 1 litro)
SL1	NaNO ₃	25 g	10 ml
SL2	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5 g	10 ml
SL3	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g	10 ml
SL4	K ₂ HPO ₄	7,5 g	10 ml
SL5	KH ₂ PO ₄	17,5 g	10 ml
SL6	NaCl	2,5 g	10 ml
SL7	EDTA solution	see following recipe	1 ml
SL8	Acidified iron solution	see following recipe	1 ml
SL9	H ₃ BO ₃	11,42 g	1 ml
SL10	Trace metals solution	see following recipe	1 ml

- *Solución EDTA*

Solución Stock	Componente	Cantidad (para 1 litro)
SL7	EDTA	50,00 g
	KOH	31,00 g

- *Solución acidificada de hierro*

Solución Stock	Componente	Cantidad (para 100 ml)
SL8	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,498 g
	H ₂ SO ₄ (96%)	0,1 ml

- *Solución metales traza*

Solución	Componente	Cantidad (para 1
-----------------	-------------------	-------------------------

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Stock		litro)
SL8	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 g
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44 g
	MoO ₃	0,71 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 g
	Co(NO ₃)2.6H ₂ O	0,49 g

Se debe utilizar agua destilada y una vez preparado el medio el pH debe estar el rango de 5,5 a 6,6. Finalmente se debe esterilizar en el autoclave a 121 ° C durante 20 minutos para posteriormente proceder a la siembra de las microalgas. (Fraunhofer, 2005).

Condiciones de cultivo

- **Cultivo inicial**

Para el primer *batch* se inoculó 100 mL en cada uno de los fotobiorreactores con un número inicial de 15157 cel/mL de las cepas *Vischeria/Scenedesmus sp.*

En el caso del segundo *batch* de microalgas se inoculó 50 mL en cada uno de los fotobiorreactores con un número inicial de 2342 cel/ml de la cepas *Chlorella/Monoraphidium Contortum sp.*

- **Fotobiorreactores**

Reactores cilíndricos de vidrio, transparentes y lisos con un volumen total de 4000 cc los cuales contenían el medio BBM para el crecimiento de las microalgas. Para establecer la cinética de crecimiento de cada uno de los fotobiorreactores se utilizó el modelo de crecimiento exponencial $N = N_0 * (2)^n$ en ambos consorcios de microalgas.

- **Iluminación**

Entre los factores de crecimiento de estos microorganismos se podría considerar que la luz es el principal componente limitante de los cultivos fotoautótrofos, ya que a diferencia de los nutrientes y CO₂, este no puede ser agregado al medio en exceso como los dos anteriores.

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Considerando que la energía lumínica no se puede acumular, es un factor que debe ser incorporada de forma continua (AST ingeniería S. L., 2013).

La energía lumínica que se proporcionó a las microalgas fue de forma artificial mediante lámparas LED'S de en un fotoperiodo de 24 horas, las cuales se han determinado ser la fuente más eficiente y económica emitiendo más del 98% de su luz entre 600 y 700 nm (AST ingeniería S. L., 2013)

- **Temperatura**

El control de temperatura se realizó mediante la implementación de un calefactor con el fin de mantener un rango de temperatura estable durante el periodo de crecimiento celular manteniendo una variación de ± 2 °C en el proceso y controlando dicho parámetro diariamente mediante un sensor de temperatura.

- **Aireación**

Se desarrolló un sistema de aireación para la homogenización y oxigenación de los cultivos utilizando mangueras y alambre de acero inoxidable y un compresor modelo TIGER de 50 litro de capacidad con el fin de evitar la sedimentación de la biomasa en las paredes de los fotobiorreactores y la distribución homogénea de los nutrientes presentes en el medio BBM.

Para el cultivo de los consorcios de microalgas se establecieron las siguientes condiciones de iluminación, temperatura, PH y aireación:

Tabla 2. Condiciones de cultivo microalgas

Iluminación	Lámparas LED's
Temperatura	28±2
PH	6,6
Aireación	Constante

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Conteo celular

Conteo celular mediante el uso de microscopio

Para el conteo celular se aplicaron dos métodos: se usó la cámara de Neubauer como método directo, la cual es una placa de cristal con forma similar al de un portaobjetos. En la parte central de la placa existe una retícula cuadrangular. La retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado. Subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1mm de lado cada uno (Bastidas, 2011).

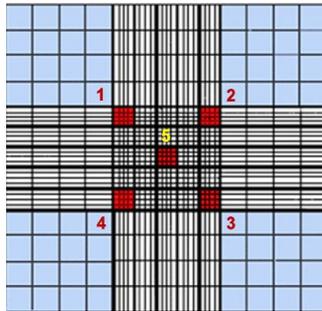


Figura 3. Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer

Fuente: (Bastidas, 2011)

Para la realización del conteo celular en el microscopio se deben contar el número de células presentes en los cuadrantes de color rojo considerando que para esto se enumeran las células de los cuadrados más pequeños realizándolo en forma de zigzag (Bastidas, 2011)

La siguiente fórmula según (Bastidas, 2011) para sacar la concentración de células por mililitro es la siguiente:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Total células contadas} \times 10.000}{\text{Número de cuadrados} \times \text{dilución}}$$

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Determinación de la concentración celular por densidad óptica

La concentración celular se puede estimar de igual manera usando la densidad óptica como un método indirecto y ciertamente menos preciso que el conteo celular en el microscopio, sin embargo es una manera rápida de evaluar la concentración del cultivo de microalgas. Para la aplicación de este método se debe establecer curvas de correlación lineal entre dos variables que en este caso son la concentración celular obtenida mediante conteo directo junto con la absorbancia (Arredondo-vega, 2007).

Para la determinación de la longitud de onda algunos autores siguieron medir a 675 nm siendo este valor cercano al pico de absorción de la clorofila, lo cual evita que a concentraciones bajas de microalgas se permita realizar la lectura con el mínimo de errores por lo tanto se usó ese valor para ambos consorcios de microalgas en la medición de la concentración celular (Arredondo-vega, 2007).

Obtención de biomasa seca

Una vez que se determinó la culminación de la fase exponencial de crecimiento celular mediante conteo directo, se procedió a cosechar las microalgas. *“Entre los métodos de recuperación de la biomasa se pueden encontrar centrifugación, sedimentación, filtración, flotación y floculación”* (Hern, 2014).

Para la recolección de la biomasa se utilizó el método de centrifugación siendo este uno de los más eficaces, pero económicamente inviable a gran escala para la gran demanda de energía que se requiere en dicho proceso. Se usó una centrifuga modelo K de International Equipment Co. de 1 litro de capacidad y $\frac{3}{4}$ HP para recolectar en pellets la biomasa separada que posteriormente pasó a disrupción celular a -80°C y al secado final en la estufa durante 1 hora a 105°C .

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Pretratamiento de la biomasa

Antes de proceder a la caracterización de la biomasa seca se debe acondicionar la misma garantizando que ningún componente sea retenido por la pared celular de estos microorganismos por lo tanto es imprescindible para la cuantificación de lípidos y proteínas romper dicha barrera. Para proceder a la evaluación es necesario la disrupción celular la cual permite la cuantificación de los componentes y biomoléculas en su totalidad facilitando el proceso de extracción.

Por tal razón es significativo tener en cuenta diferentes métodos para obtener el mejor rendimiento en la caracterización, entre los más destacados para romper la pared celular se encuentran la deshidratación por liofilización, congelamiento, reducción de tamaño de partícula, ondas de ultra-sonido, y homogenización en alta presión, microondas y ultrasonido (Oliveira-leite & Reis-, 2013).

En este caso, para realizar la disrupción celular de los consorcios de microalgas *Vischeria/Scenedesmus sp* y *Chlorrella/Monoraphidium Contortum sp* se tomaron las muestras de biomasa siendo estas resuspendidas en una solución buffer de extracción para posteriormente congelar a -80°C durante 24 horas.

Extracción y cuantificación de lípidos

Para la extracción de lípidos se implementó el método estándar de extracción de muestras sólidas conocido como Soxhlet. Su sistema se compone de un matraz, una cámara de extracción y un condensador. Para la elección del solvente se buscó el mejor rendimiento del proceso de extracción por lo tanto se utilizó una mezcla binaria cloroformo: metanol (1:2) con el objetivo de captar los diferentes tipos de lípidos presentes en la biomasa de microalgas (García, 2011). Para la extracción se hicieron ensayos por duplicado tomando en cuenta que este método no presenta mayores errores en su aplicación; inicialmente se secaron a 105°C

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

dos balones de 500 mL en la estufa durante una hora para tomar el peso de los matraces sin grasa.

Para cada extracción se tomaron 5 gramos de biomasa seca de los diferentes consorcios añadiendo 300 mL la mezcla binaria de solventes en el matraz de extracción. La extracción se realizó en un periodo de 8 horas garantizando que el proceso de sifonamiento ocurra tres veces y una vez terminado el proceso se recuperó el solvente mediante destilación simple. Finalmente se pesan los balones con grasa para determinar el contenido lípido por diferencia con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{m2 - m1}{m * 100}$$

m: peso de la muestra
m1: tara del matraz solo
m2: peso matraz con grasa

Perfil lipídico

Para realizar el perfil lipídico en la biomasa de microalgas se utilizó el método de cromatografía en capa fina (T.L.C). Para la realización del perfil lipídico se usaron placas preparadas de sílica gel marca MERCK y una solución de ácido bórico para su activación en la estufa a 120°C durante un periodo de una hora, para la preparación de la solución de ácido bórico a 0,4 molar se usó las siguientes relaciones:

- PM del $H_3BO_3 = 61,83 \text{ gr/mol}$.
- Volumen = 0,1 L = 100 ml.,

$$M = \frac{\text{moles}}{L}; \text{moles} = M * L; \text{moles} = 0,4 \frac{\text{moles}}{L} * 01 L = 0,04 \text{ moles}$$

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

$$\text{mol} = \frac{\text{gr}}{\text{PM}}; 0,04 \frac{\text{moles}}{61,83 \text{ gr/mol}} = 2,47 \text{ gramos de ácido bórico}$$

(Antequera & Martinez, 2006).

Para la preparación de la muestra se tomó 10 gramos de biomasa seca de los dos consorcios de microalgas y se agregó 300 μL de cloroformo: metanol (2:1). Se procedió a centrifugar las muestras durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante y se realizó el mismo procedimiento con el pellet de biomasa restante dos veces más tomando un volumen de 300 μL de solvente en el primero y 400 μL en el segundo para sumar un volumen total de 1 mL de sobrenadante transvasado (Antequera & Martinez, 2006).

Una vez activadas las placas en la estufa se sembró la muestra a 1 cm del borde inferior en fracciones de 2 μL hasta llegar a concentrar la muestra a 100 μL respetando el intervalo de secado. Una vez realizada la siembra se procedió a la preparación del solvente o fase móvil de la T.L.C con una mezcla de cloroformo/metanol/agua/ hidróxido de amonio (70:30:3:2), y se culminó la corrida a 1cm del borde superior dejando secar las placas a temperatura ambiente para su posterior revelado (Antequera & Martinez, 2006)

Una vez que se separaron los componentes se creó una atmosfera generalmente de yodo con el objetivo de revelar las placas. Terminado el proceso se formaron complejos o bandas coloreados con los diferentes componentes orgánicos presentes en la muestra en tonos marrones y amarillos para su identificación.

Como marcador para el perfil lipídico se utilizó lecitina de soya la cual tiene en su composición fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina con Rf (Ratio of Front) de 0,13, 0,68, 0,20 y 0,75 respectivamente coincidiendo con datos propuestos en la literatura (Tamargo-Santos, 2011).

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Rf= Distancia de la muestra desde el origen/Distancia del eluyente desde el origen (Sánchez, 2010)

Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se aplicó el método de Biuret. Para la aplicación de este método se realizó en primera instancia una recta estándar usando una solución de seroalbúmina bovina (BSA), el cual se usa generalmente en este tipo de análisis (Keppy & Allen, 2000).

Preparación del reactivo de biuret

Se realizó en un matraz de 1000 mL con 700 mL de agua destilada y un imán agitador se lo coloca en un agitador magnético. Se disuelven 3,8 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6,7 g de NaEDTA mientras se realiza la agitación, añadir 200 mL de NaOH.5 N y adicionar 1g de KI. (Bravo, 2017).

Una vez preparado el reactivo de Biuret el cual se dejó 24 horas en reposo se acondiciono las muestras de biomasa seca pesando 25 mg en 1 mL de buffer de extracción para proceder a medir en el espectrofotómetro a 570 nm. Basándose en la ecuación de la recta estándar de proteínas (Tabla 3) realizada con el indicador, en este caso, seroalbumina bovina, se cuantificó el porcentaje de proteínas de las muestras de los diferentes consorcios de microalgas. Las concentraciones utilizadas en la elaboración de la recta estándar fueron realizadas a partir de 20 mg/L de proteína estándar de seroalbumina bovina.

Tabla 3. Recta estándar

Seroalbúmina μL	Buffer extracción μL	Biuret mL
0	100	1
25	75	1
50	50	1
75	25	1
100	0	1

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Tabla 4. Datos para la elaboración de la recta estándar

Absorbancia 545nm	Concentración BSA mg/mL
0,000	0
0,073	0,5
0,122	1
0,183	1,5
0,237	2



Figura 4. Recta estándar cuantificación de proteínas método Biuret

Caracterización de proteínas mediante electroforesis

El proceso de electroforesis consiste en la migración de solutos iónicos cuando se aplica un campo eléctrico desplazando de esta manera dichos componentes hacia el cátodo y ánodo dependiendo de su carga, peso y estructura. Es un método muy aplicado al momento de determinar ácidos nucleicos y proteínas. Los analitos migran a través de un gel u otro tipo de matriz porosa separándose en bandas las cuales son teñidas con diferentes colorantes facilitando así la visualización para su posterior análisis e interpretación.

Se preparó el gel de separación (Tabla 5) respetando el intervalo de polimerización en las placas de vidrio. Una vez polimerizado se procedió con el gel de *stacking* (Tabla 6) hasta que ocurra el mismo proceso tomando en cuenta que se debe colocar el peine el cual formará los compartimentos para las muestras a analizar.

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Para la preparación de las muestras se aplicó un buffer de extracción en 50 mg de biomasa seca manteniéndose a -80°C durante un periodo de 24 horas para su posterior rompimiento celular. Se tomaron una muestra de $7,5\ \mu\text{L}$ del homogenizado, del sobrenadante y del pellet después de centrifugar durante 5 minutos. Es decir por cada consorcio de microalgas se obtuvieron 3 muestras (H, S Y P) las cuales se mezclaron con $7,5\ \mu\text{L}$ de *loading buffer 2x* (Tabla 7) las cuales fueron colocadas en los compartimentos del gel de *stacking* anteriormente preparado.

Finalmente se dejó correr hasta que las muestras alcanzaron el final del gel de separación y una vez culminada la electroforesis se aplicó azul de Comassie con el objetivo de teñir las bandas. Se aplicó solución de desteñido (Tabla 8) en agitación constante la cantidad de veces que fueron necesarias hasta que el gel perdió el fondo azul para su análisis e identificación.

Tabla 5. Soluciones para la preparación del gel de separación en la cuantificación de proteínas mediante electroforesis

Gel de separación	
Agua destilada	2,05 mL
Monómero Acrilam-Bis-Acrilam. 30%	1,65 mL
Buffer de separación	1,25 mL
SDS	0,05 mL
PSA 10%	25 μL
TEMED	5 μL

Tabla 6 .Soluciones para la preparación del gel de stacking en la cuantificación de proteínas mediante electroforesis

Gel de Stacking	
Agua destilada	2,4 mL
Monómero Acrilam-Bis-Acrilam. 30%	0,6 mL
Buffer de separación	1,0 mL
SDS	0,04 mL
PSA 10%	25 μL
TEMED	5 μL

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Tabla 7 .Reactivos para la preparación del loading buffer 2x

<i>Loading buffer 2X</i>	
<i>Stacking buffer</i>	2,5 mL
SDS %	4,0 mL
Glicerol	1,0 mL
Bromofenol azul	2,0 mg
dithiothreitol	0,31 g
ddh2O	10,0 mL

Tabla 8 .Reactivos para la preparación de la solución de desteñido en la cuantificación de proteínas mediante electroforesis

Solución de desteñido	
Metanol	30 mL
Ácido acético	10 mL
Agua destilada	60 mL

RESULTADOS

Modelo y cinética de crecimiento (Vischeria/Scenedesmus sp)

Crecimiento exponencial

Cuando hablamos de microorganismos, el crecimiento se produce de manera exponencial, es decir, es una progresión geométrica de base 2. Esto se explica de la siguiente manera, cuando dos células se dividen se transforman en cuatro y dicho proceso se puede expresar como $2^1 \rightarrow 2^2$. Cuando estas cuatro pasan a ocho de igual manera se representa mediante $2^2 \rightarrow 2^3$ y así de manera sucesiva. La relación directa entre el número de células que existen en el inicio de un cultivo y al finalizar este periodo se puede expresar de la siguiente manera en donde (Madigan, Martinko, & Parker, 2013).

N: número final de células

N_0 : Número inicial de células

n: número de generaciones que han ocurrido

$$N = N_0 * (2)^n$$

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

$$\log N - \log N_0 = n \log 2$$

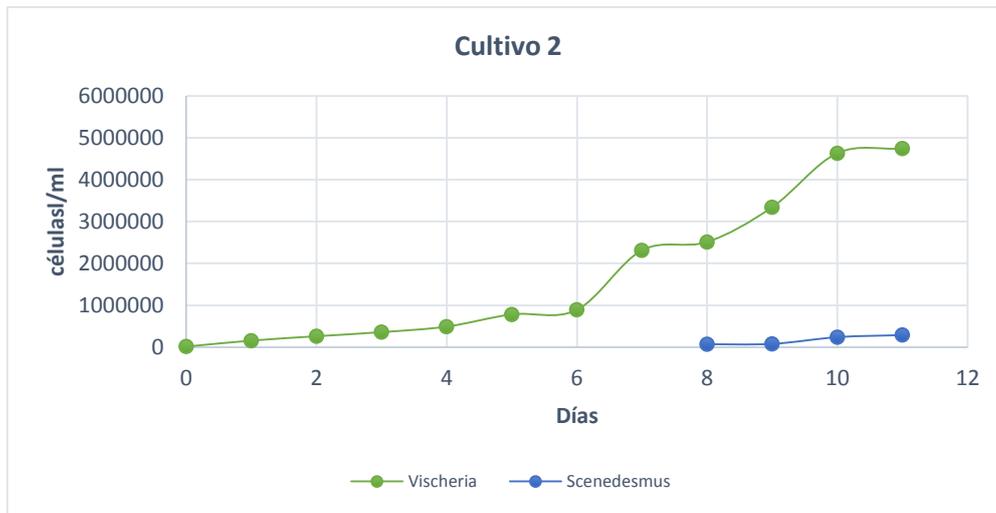
$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{0,301}$$

$$n = 3,3 * (\log N - \log N_0)$$

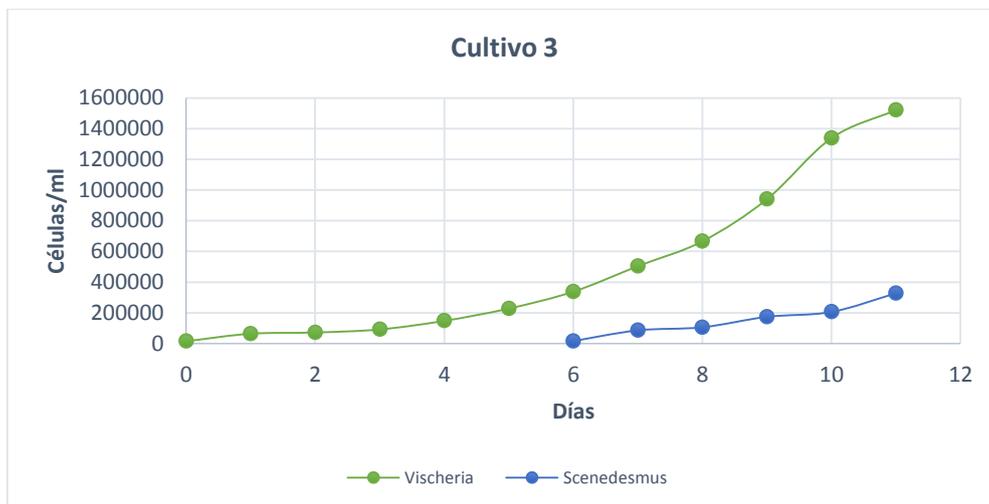
EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Figura 5 (a) Cinética de crecimiento del consorcio *Vischeria/Scenedesmus sp* en medio Bold's Bosal mediante conteo celular cultivo 2



N₀	492000
N	4632000
n	3,21

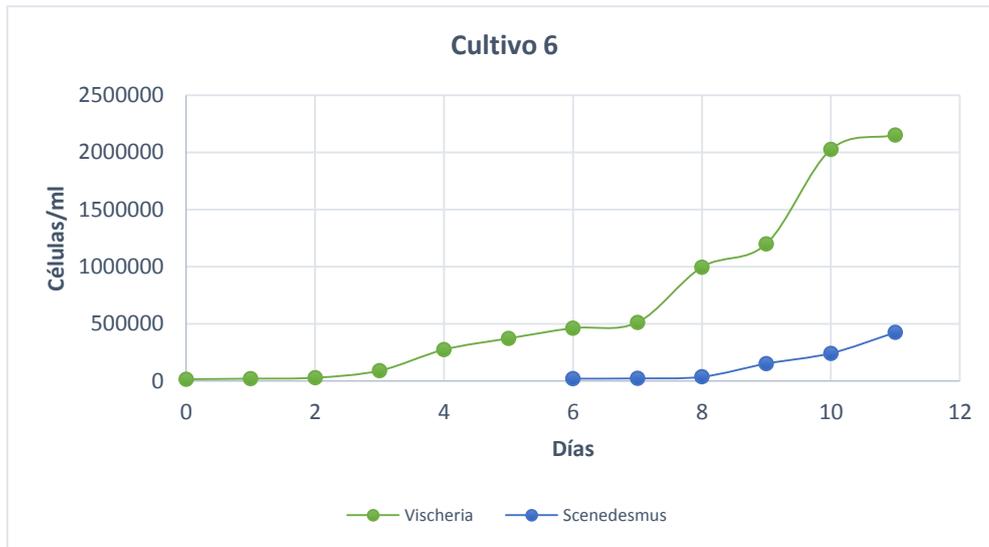
Figura 5 (b) Cinética de crecimiento del consorcio *Vischeria/Scenedesmus sp* en medio Bold's Bosal mediante conteo celular cultivo 3



N₀	274000
N	2024242
n	2,86

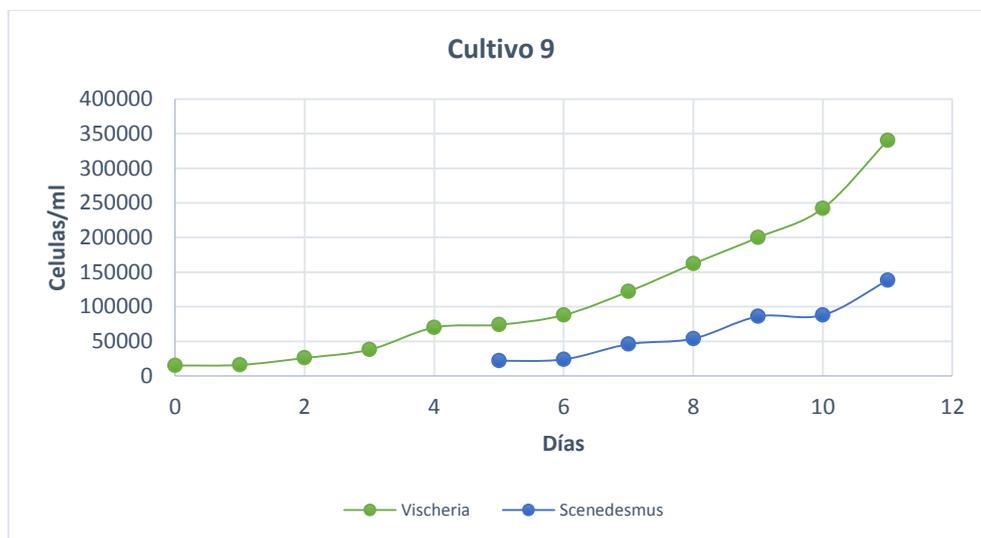
EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Figura 5 (c) Cinética de crecimiento del consorcio *Vischeria/Scenedesmus sp* en medio Bold's Bosal mediante conteo celular cultivo 6



N₀	148000
N	1521212
n	3,33

Figura 5 (d) Cinética de crecimiento del consorcio *Vischeria/Scenedesmus sp* en medio Bold's Bosal mediante conteo celular cultivo 9

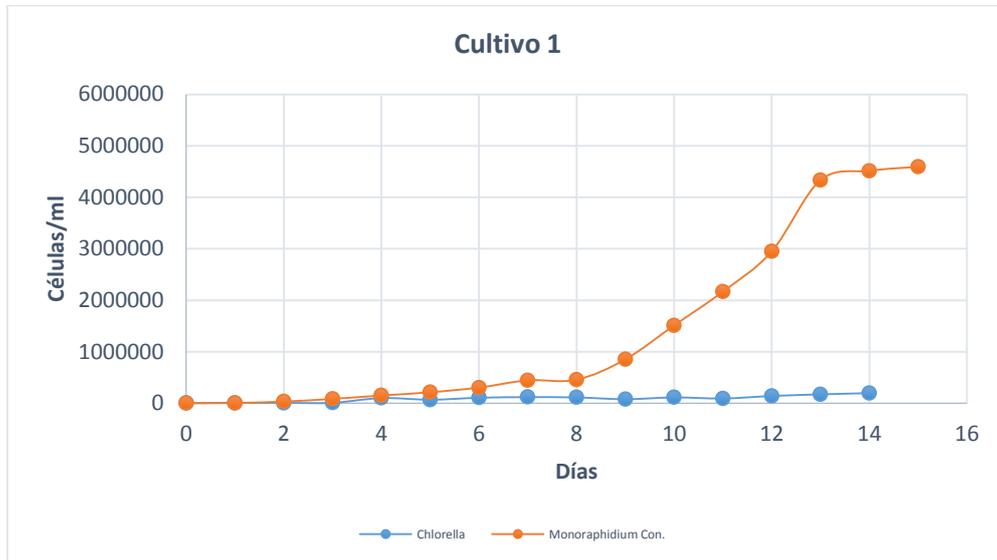


N₀	70000
N	242000
n	1,77

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

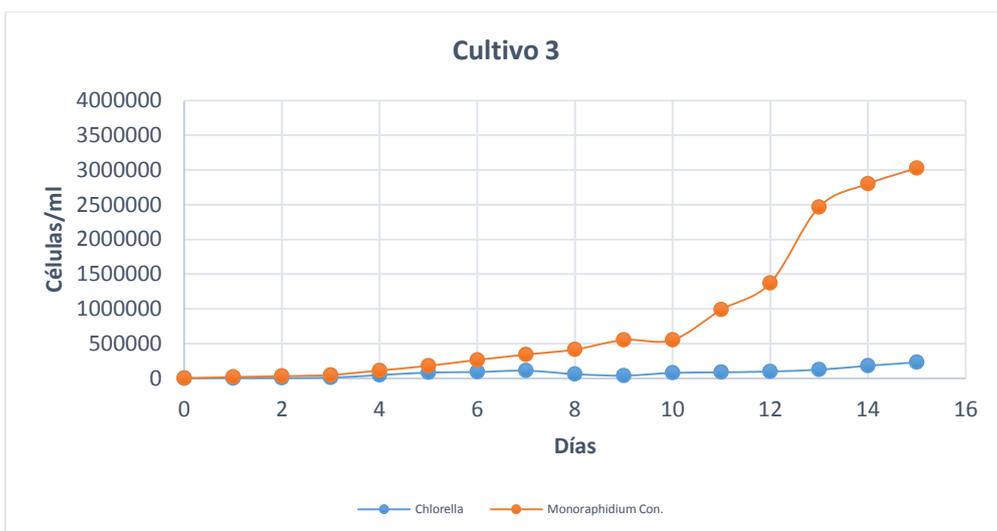
Modelo y cinética de crecimiento (*Chlorella/Monoraphidium Contortum* sp)

Figura 6 (a). Cinética de crecimiento del consorcio *Chlorella/Monoraphidium Contortum* sp en medio Bold's Bosal mediante conteo celular cultivo 1



N_0	444000
N	4333333
n	3,27

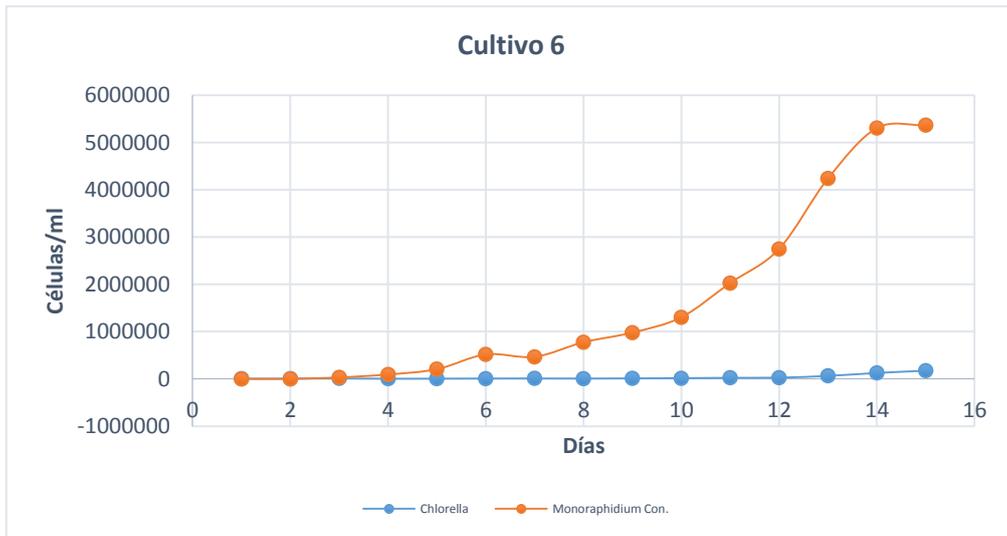
Figura 6 (b). Cinética de crecimiento del consorcio *Chlorella/Monoraphidium Contortum* sp en medio Bold's Bosal mediante conteo celular cultivo 3



N_0	342000
N	2800000
n	3,01

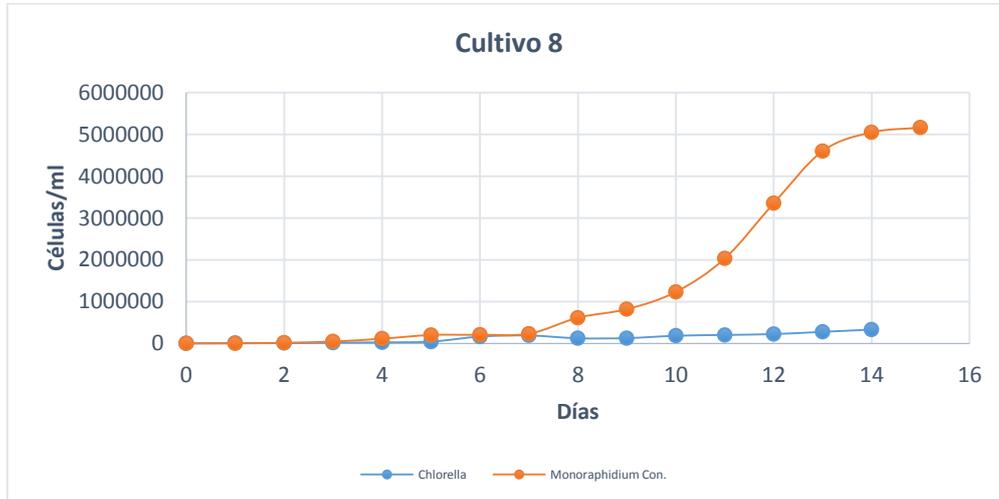
EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA
 COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Figura 6 (c). Cinética de crecimiento del consorcio *Chlorella/Monoraphidium Contortum sp*
 en medio Bold's Bosal mediante conteo celular cultivo 6



N_0	468000
N	5303030
n	3,48

Figura 6 (d). Cinética de crecimiento del consorcio *Chlorella/Monoraphidium Contortum sp*
 en medio Bold's Bosal mediante conteo celular cultivo 8



N_0	232000
N	5046667
n	4,41

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Densidad óptica correlación (*Vischeria/Scenedesmus sp*)

Figura 7 (a). Correlación de la concentración celular del cultivo 2 en BBM vs la densidad óptica.

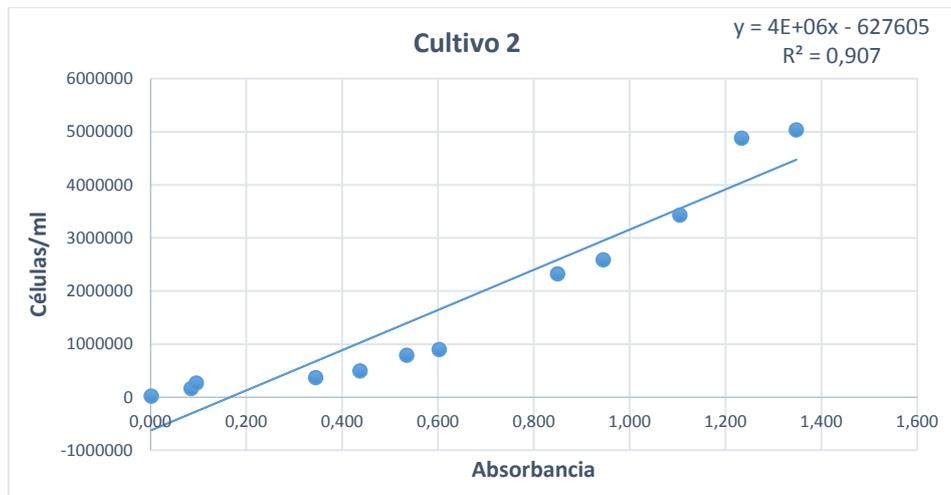


Figura 7 (b). Correlación de la concentración celular del cultivo 3 en BBM vs la densidad óptica.

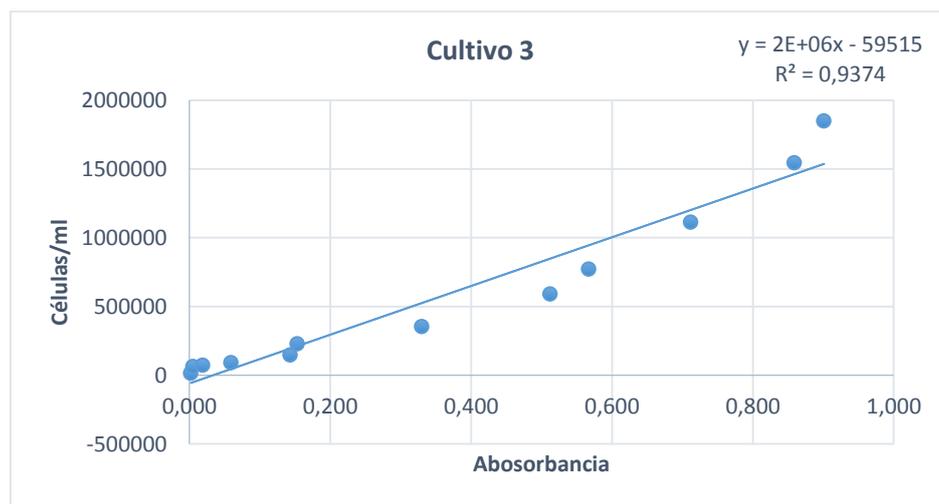
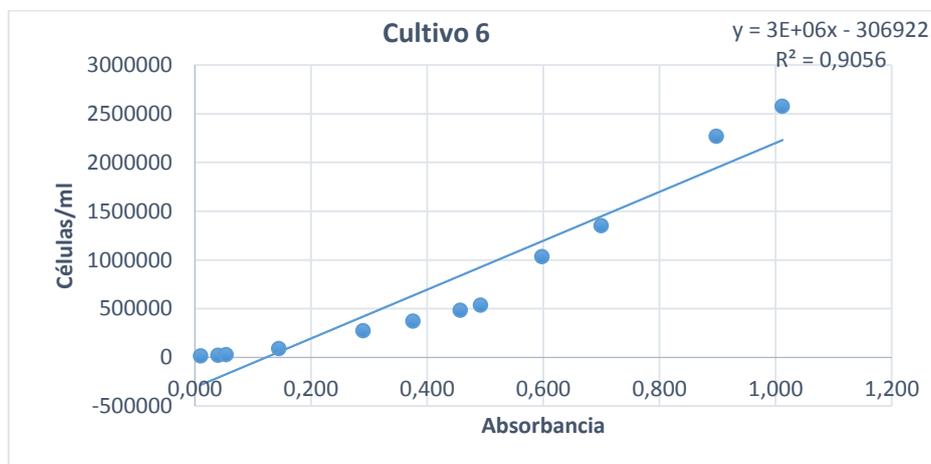
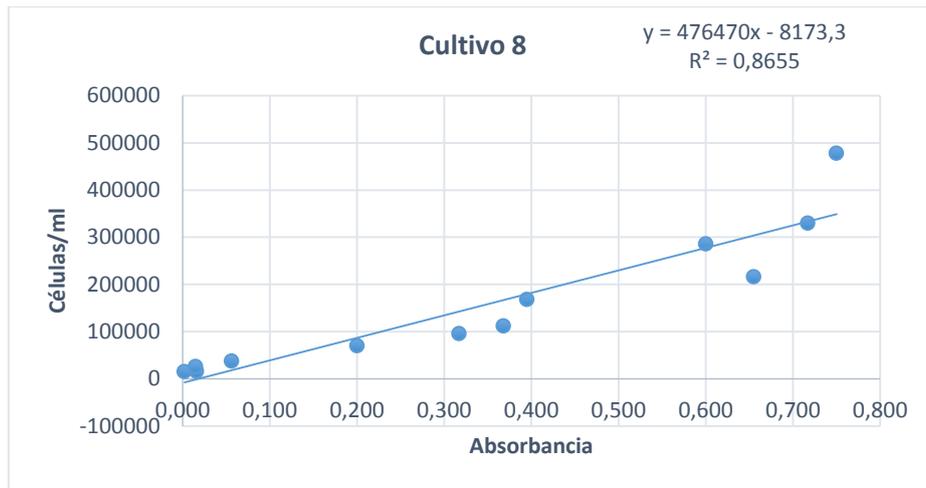


Figura 7 (c). Correlación de la concentración celular del cultivo 6 en BBM vs la densidad óptica.



EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Figura 7 (d). Correlación de la concentración celular del cultivo 8 en BBM vs la densidad óptica.



Densidad óptica correlación (*Chlorella/Monoraphidium Contortum* sp)

Figura 8 (a). Correlación de la concentración celular del cultivo 1 en BBM vs la densidad óptica.

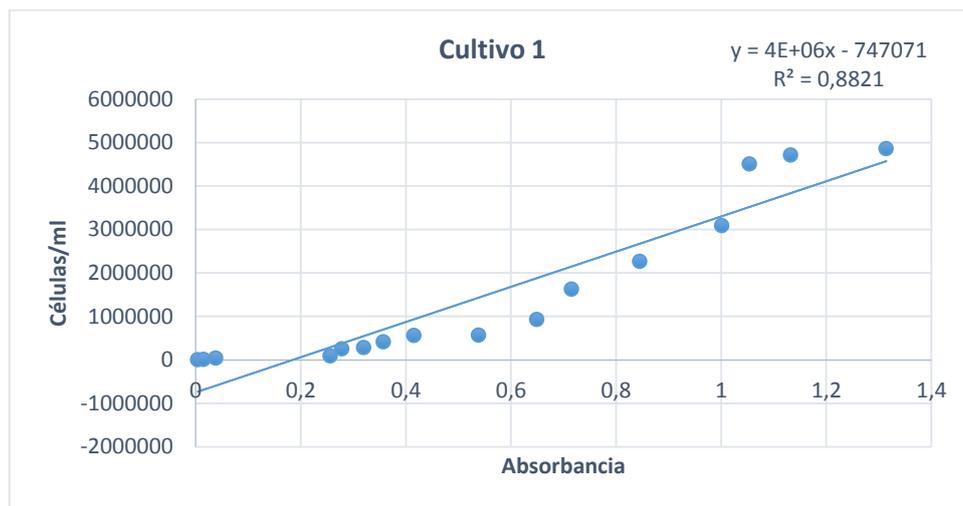
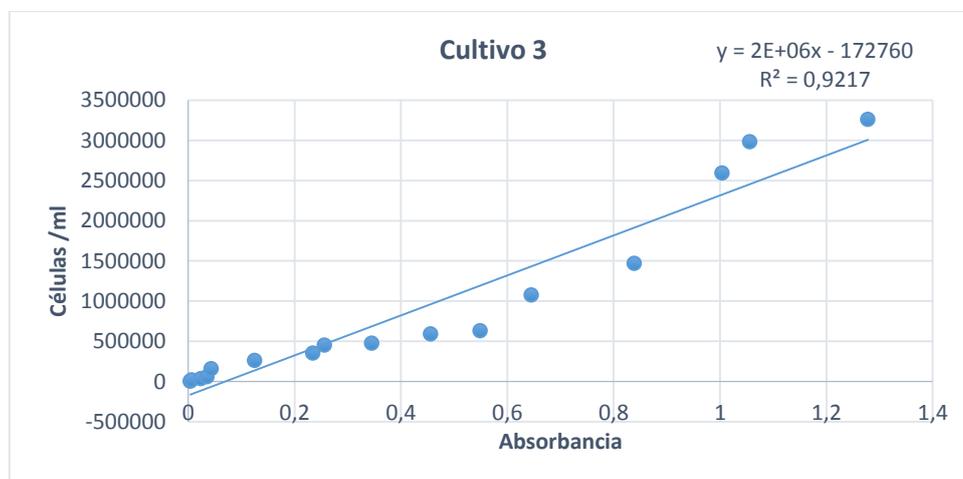


Figura 8 (b). Correlación de la concentración celular del cultivo 3 en BBM vs la densidad óptica.



EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Figura 8 (c). Correlación de la concentración celular del cultivo 6 en BBM vs la densidad óptica.

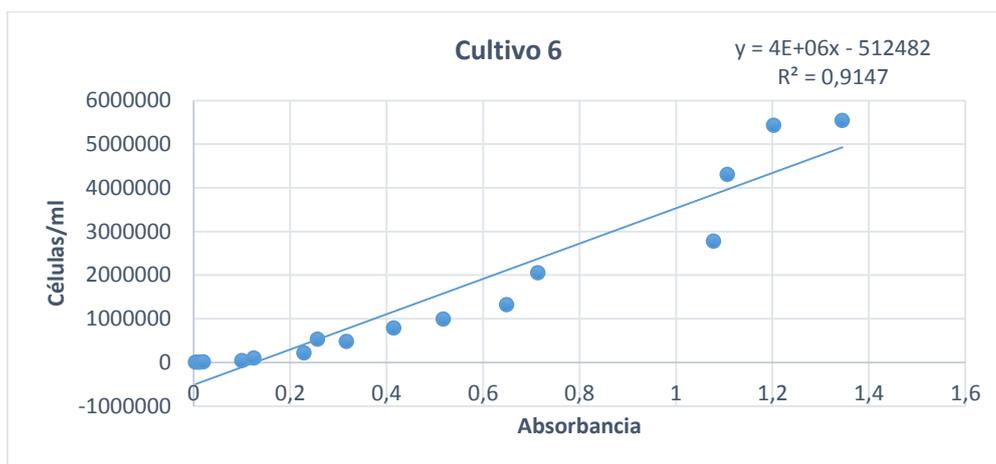


Figura 8 (d). Correlación de la concentración celular del cultivo 8 en BBM vs la densidad óptica.



Productividad de biomasa seca

- (*Vischeria/Scenedesmus sp*)

Tabla 9. Productividad biomasa seca consorcio *Vischeria/Scenedesmus sp*

Productividad g biomasa seca/L			
	g	L	g/L
Cultivo 2	3,0211	2,220	1,36
Cultivo 3	2,0567	2,714	0,75
Cultivo 6	2,4465	2,110	1,15
Cultivo 9	2,1456	2,234	0,96
Total	26,48		gramos

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA
 COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

- (*Chlorella/Monoraphidium Contortum sp*)

Tabla 10. Productividad biomasa seca consorcio *Vischeria/Scenedesmus sp*

Productividad g biomasa seca/L			
	g	L	g/L
Cultivo 1	3,0976	2,150	1,50
Cultivo 3	2,4279	2,180	1,42
Cultivo 6	3,2848	2,045	1,60
Cultivo 8	3,2357	2,53	0,95
Total	31,53		
	gramos		

Cuantificación de lípidos

- (*Vischeria/Scenedesmus sp*)

Tabla 11 (a). Ensayo 1 cuantificación de lípidos totales consorcio
Vischeria/Scenedesmus sp

m: peso de la muestra g	5,00
m1: tara del matraz solo g	180,5498
m2: peso matraz con grasa g	181,3538
Lípidos totales	16 %

Tabla 11 (b). Ensayo 2. Cuantificación de lípidos totales consorcio
Vischeria/Scenedesmus sp

m: peso de la muestra g	5,00
m1: tara del matraz solo g	182,3525
m2: peso matraz con grasa g	183,1219
Lípidos totales	15 %

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA
COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Tabla 11 (c). Producción diaria de lípidos consorcio *Vischeria/Scenedesmus sp*

N°	g*L ⁻¹	g L ⁻¹ *día ⁻¹	lípidos g L ⁻¹ *día ⁻¹
Cultivo 2	1,36	0,11	0,018
Cultivo 3	0,75	0,06	0,010
Cultivo 6	1,15	0,09	0,015
Cultivo 9	0,96	0,08	0,012

○ (*Chlorella/Monoraphidium Contortum sp*)

Tabla 12 (a). Ensayo 1 Cuantificación de lípidos totales consorcio
Chlorella/Monoraphidium Contortum sp

m: peso de la muestra g	5,00
m1: tara del matraz solo g	189,0063
m2: peso matraz con grasa g	191,1002
Lípidos totales	42 %

Tabla 12 (b). Ensayo 2. Cuantificación de lípidos totales consorcio
Chlorella/Monoraphidium Contortum sp

m: peso de la muestra g	5,00
m1: tara del matraz solo g	179,1516
m2: peso matraz con grasa g	181,2157
Lípidos totales	41 %

Tabla 12 (c). Producción diaria de lípidos consorcio *Chlorella/Monoraphidium
Contortum sp*

N°	g*L ⁻¹	g L ⁻¹ *día ⁻¹	lípidos g L ⁻¹ *día ⁻¹
Cultivo 1	1,50	0,12	0,020
Cultivo 3	1,42	0,11	0,018
Cultivo 6	1,60	0,13	0,021
Cultivo 8	0,95	0,07	0,012

Perfil lipídico

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA
 COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

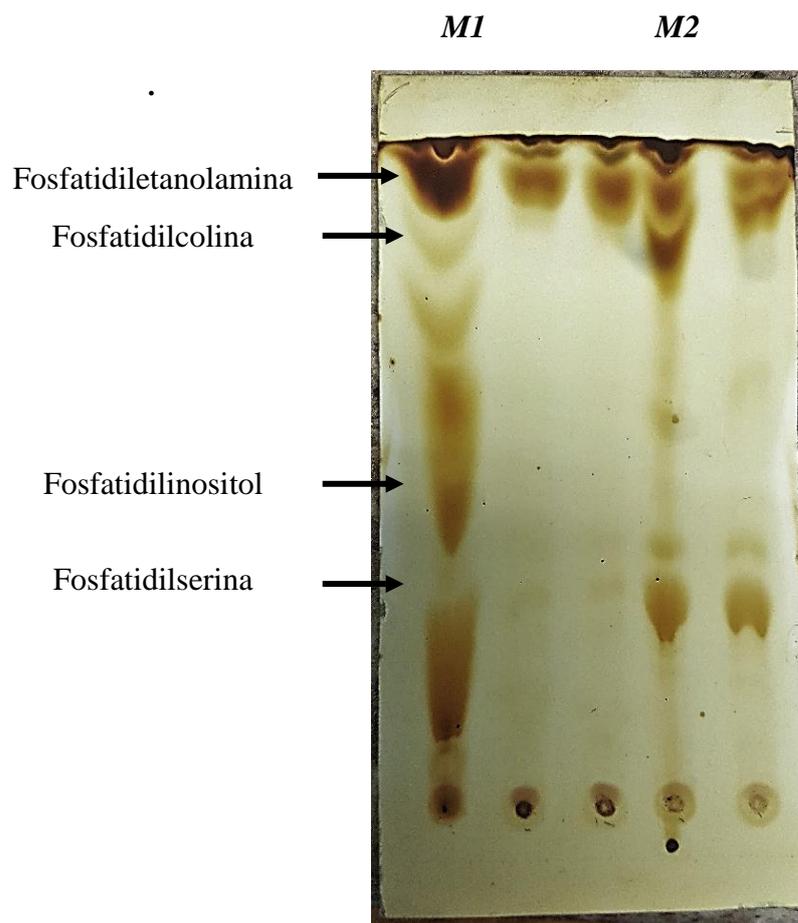


Figura 9. Identificación de compuestos lipídicos empleando como marcador lecitina de soya

Tabla 13. Datos de los compuestos lipídicos relacionados por Cromatografía en Capa Fina

	Rf	M1 (Primer consorcio)	M2 (Segundo consorcio)
Fosfatidilserina	0,13	-	-
Fosfatidilinositol	0,20	0,25	0,23
Fosfatidilcolina	0,68	-	0,73
Fosfatidiletanolamina	0,80	0,83	0,82

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Cuantificación de proteínas método biuret

Tabla 14. Contenido de proteínas en las muestras de ambos consorcios de microalgas

Consortio	Muestra	Abs 570nm	Proteína mg	Dilución	% Proteína
<i>Vischeria/Scenedesmus sp</i>	H1	0,210	1,74	0,08	0,17
	S1	0,135	1,10	1,10	2,20
	P1	0,169	1,39	0,34	0,69
<i>Chlorella/Monoraphidium Contortum sp</i>	H1	0,090	0,71	0,23	0,47
	S1	0,182	1,50	0,75	1,50
	P1	0,112	0,90	0,22	0,45

Cuantificación de proteínas electroforesis

Figura 10. Gel de cuantificación de proteínas mediante electroforesis



DISCUSIÓN

Cinética de crecimiento

En relación al modelo de crecimiento del primero consorcio (*Vischeria-Scenedesmus*) se puede observar en las figuras 5 (a) (b) (c) y (d) que las condiciones de cultivo anteriormente citadas favorecieron el crecimiento de la cepa *Vischeria sp* estableciendo mediante conteo celular el crecimiento exponencial de la misma en un periodo de cultivo de 12 días. Por otra parte la cepa *Scenedesmus sp* a diferencia de la cepa anterior en las mismas condiciones de cultivo no entró en fase exponencial de crecimiento representando en el cultivo de mayor crecimiento el 28 % de las células totales.

Para la cinética de crecimiento del segundo consorcio de microalgas (*Chlorella-Monoraphidium Contortum sp*) puede observar en las figuras 6 (a) (b) (c) y (d) que las condiciones de cultivo anteriormente citadas favorecieron el crecimiento de la cepa *Monoraphidium Contortum sp* estableciendo mediante conteo celular el crecimiento exponencial de la misma en un periodo de cultivo de 15 días. Por otra parte la cepa *Chlorella sp* a diferencia de la cepa anterior en las mismas condiciones de cultivo no entró en fase exponencial de crecimiento representando en el cultivo de mayor crecimiento el 6 % de las células totales.

Correlación densidad óptica

En relación a la medición de la concentración celular mediante el método indirecto de densidad óptica las figuras 7 (a) (b) (c) y (d) sugieren que el método no se ajusta de forma precisa dando valores de la correlación de 0,90; 0,93; 0,90 y 0,86 respectivamente para el primer consorcio de microalgas (*Vischeria/Scenedesmus sp*).

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

En relación a la medición de la concentración celular mediante el método indirecto de densidad óptica, las figuras 8 (a) (b) (c) y (d) sugieren que el método no se ajusta de forma precisa dando valores de la correlación de 0,88; 0,91; 0,92 y 0,94 respectivamente para el segundo consorcio de microalgas. (*Chlorella/Monoraphidium Contortum sp*).

En el caso de la aplicación de la densidad óptica como un método indirecto para estimar la concentración celular en los cultivos, los datos sugieren que dicho método no es viable cuando no se tiene un cultivo axénico de microalgas, dando como resultado correlaciones bajas.

Productividad de biomasa seca

Se pudo determinar la productividad de biomasa seca en los fotobiorreactores a los cuales se les dio seguimiento estableciendo que para el primer consorcio de microalgas en un periodo de 12 días el cultivo de menor productividad fue de 0,75 g/L y el de mayor de 1,36 g/L dando un total en los 10 cultivos de 28,48 gramos de biomasa seca para su posterior caracterización

La productividad de biomasa seca en los fotobiorreactores a los cuales se les dio seguimiento para el segundo consorcio de microalgas en un periodo de 15 días fue de 0,95 g/L para el de mejor productividad y el de mayor de 1,60 g/L. dando un total en los 10 cultivos de 31,53 gramos de biomasa seca para su posterior caracterización

Cuantificación de lípidos

Para la extracción y cuantificación de lípidos totales mediante el método estándar Soxhlet se determinó que el porcentaje de lípidos totales contenidos en el primero consorcio de microalgas (*Vischeria-Scenedesmus*) es de 16% con un periodo de extracción de 8 horas en una mezcla binaria de solvente cloroformo : metanol (1:2) realizando el proceso por duplicado.

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

El porcentaje de lípidos totales contenidos en el segundo consorcio de microalgas (*Chlorella-Monoraphidium Contortum sp*) es de 42 % con un periodo de extracción de 8 horas en una mezcla binaria de solvente cloroformo: metanol (1:2) realizando el proceso por duplicado.

Perfil lipídico

Para el perfil lipídico la (tabla 13) muestra los Rf del indicador empleado en este caso lecitina de soya el cual contiene fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina y comparándolos con las muestras M1 para el primer consorcio formado por las cepas *Vischeria/Scenedesmus sp* sugiere la presencia de fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina con Rf de 0,25 y 0,87 respectivamente. Para M2 correspondiente al segundo consorcio formado por *Chlorella/Monoraphidium Contortum sp* se puede observar la presencia de fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina con Rf de 0,23, 0,73 y 0,85 respectivamente.

Cuantificación de proteínas Biuret y Electroforesis

Para la determinación de proteínas mediante el método de Biuret se puede observar en la (tabla 14) que para ambos consorcios el contenido total de proteínas es muy bajo dando un 2 % para el primero y 1 % para el segundo, sugiriendo que el pretratamiento de la muestra, es decir el rompimiento de la pared celular, no se está dando de manera eficiente por lo tanto no se están cuantificando estas biomoléculas en su totalidad siendo el rendimiento de la extracción demasiado bajo.

Adicionalmente la cuantificación de proteínas mediante electroforesis no fue viable ya que no se logró romper la pared celular en su totalidad, comprobándose en el microscopio, es decir que la muestra de proteínas de la biomasa no fue significativa impidiendo que el proceso se desarrolle con eficiencia. Como se puede observar en la figura 9 no fue posible realizar la

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

identificación e interpretación de las bandas mediante la aplicación de la solución de azul de *Comassie*.

CONCLUSIONES

- Las condiciones de cultivo en medio BBM, pH 6,6, luz artificial continua (lámparas LED's) y aireación constante favorecen el crecimiento exponencial de la cepa *Visheria sp* en el primer consorcio de microalgas y de la cepa *Monoraphidium Contortum sp* para el segundo consorcio de microalgas.
- Si no se tiene un monocultivo o cultivo axénico de microalgas es posible que la aplicación del método indirecto para la determinación del crecimiento celular mediante densidad óptica no sea viable, dando como resultado correlaciones bajas.
- En relación a la productividad de biomasa microalgal la implementación de condiciones de cultivo a escala de laboratorio produce buenos rendimientos en el crecimiento celular de ambos consorcios de microalgas.
- Para el periodo de cultivo el inóculo inicial es un factor esencial para el comienzo o arranque de la fase exponencial de crecimiento de las microalgas en los fotobiorreactores, siendo este de 12 a 15 días hasta alcanzar la fase estacionaria.
- En la extracción de lípidos totales mediante el método Soxhlet el segundo consorcio compuesto por *Chlorella/Monoraphidium Contortum sp* tiene mejores rendimientos en la producción de biocombustibles debido a su alto contenido de lípidos totales.
- Mediante la cromatografía en capa fina T.L.C es posible la identificación de lípidos anfipáticos como son los fosfolípidos contenidos en la biomasa de consorcios de microalgas, usando lecitina de soya como indicador y una fase móvil de cloroformo/metanol/agua/hidróxido de amonio.
- Para la cuantificación de proteínas mediante el método de Biuret los datos obtenidos demuestran un contenido bajo en proteínas en ambos consorcios. Posiblemente se

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

debe al pre tratamiento de la biomasa sugiriendo que la pared celular impide la cuantificación de proteínas en su totalidad.

- En la aplicación del método por electroforesis no se logró interpretar e identificar las bandas ya que el proceso de disrupción celular mediante congelamiento no es eficiente para los consorcios de microalgas formados por (*Vischeria/Scenedesmus sp*) y (*Chlorella/Monoraphidium Contortum sp*).
- Para posteriores estudios se debe aplicar otros métodos de disrupción celular tal como la aplicación de enzimas o ácidos que garanticen el rompimiento de esta barrera para lograr con eficiencia la caracterización de biomasa de microalgas.

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, M. (2013). Evaluacion del potencial energético mi la microalga Chlorella protothecoides en el Ecuador para la obtención de biocombustibles. *Diseño de Calderas Con Regeneracion*, 54–107.
- Antequera, Y., & Martinez, E. (2006). INFORME DE SUPUL FOSFOLÍPIDOS.
- Arredondo-vega, B. O. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento, (July 2014).
- AST ingeniería S. L. (2013). Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 69.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, 1–6.
- Bravo, A. (2017). CARACTERIZACIÓN DE MICROALGAS DE LA LAGUNA DE LIMONCOCHA Y OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO IN VITRO PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASA.
- Colorado, M., Moreno, D., & Pérez, J. (2013). Desarrollo , producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. *Ambiente Y Desarrollo*, 17(32), 113–126.
- Cotidiano, E. (2009). Los Biocombustibles.
- Daniela, L. T., Carlos, H. M. A., Tejeda-benítez, L., Henao-argumedo, D., Alvear-alayón, M., & Castillo-saldarriaga, C. R. (2015). Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas Characterization and lipid profile of oil from microalgae Caracterização e perfil lipídico de azeites de microalgas, 24(39), 43–54.

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Fraunhofer. (2005). BBM-Medium (Bold's Basal Medium + soil extract + vitamins). *Culture Collection of Cryophilic Algae*, (1963), 6318.

García, J. (2011). COMPARACIÓN DE METODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE MICROALGAS A ESCALA LABORATORIO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL.

Gonz, A. D., Kafarov, V., & Guzm, A. (2009). Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas in the production line of biodiesel from microalgae, 7(2), 53–60.

Grunewald, C. fuentes. (2011). Uso De Microalgas Marinas Para La Producción De Biodiesel En Chile, 107–113. Retrieved from <http://digital.csic.es/handle/10261/52848>

Hern, A. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios, 49, 157–173.

<https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>

Keppy, N. K., & Allen, M. W. (2000). The Biuret Method for the Determination of Total Protein Using an Evolution Array 8-Position Cell Changer, 8–9.

Luis, J., Romero, S., Arturo, R., Peñaranda, N., Autonoma, U., Caribe, D. E. L., ...

Peñaranda, N. (2014). Caracterización de las microalgas para la producción de biodiesel a través de medios químicos.

Maciel, C. Á. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico:mercados actuales y comercio internacional, 63–89.

Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2013). Biología de los microorganismos.

Oliveira-leite, M., & Reis-, J. S. (2013). Desempeño de dos técnicas de rompimiento celular en la caracterización de ficobiliproteínas en la microalga *scenedesmus* sp ., 79, 65–79.

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Salas, M. (2015). Perfil lipídico de microalgas antárticas recolectadas en febrero 2013 en el archipiélago Schetland.

Sánchez, G. (2010). Comprobación de la actividad tintorera en fibras orgánicas y sintéticas.

Segoviano, A., & Islas, E. A. (2017). ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Phormidium* sp EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO PARA SU APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO. *Aguilera*, (1), 149–153.

Tamargo-Santos, B. (2011). OBTENCIÓN DE FOSFOLÍPIDOS A PARTIR DE LA LECITINA DE SOYA (*Glicine max* L), PARA USOS BIOMÉDICOS, (June 2017).

Ulloa, R. (1988). Plan De Manejo Reserva Biologica Limoncocha, 1–101.

Universidad Nacional Autónoma de México. (2007). Técnicas Cromatográficas.

Valladares, F., & Niinemets, Ü. (2008). Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173506>

Ximhai, R. (2006). PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS. *Crisis*, 2, 319–341.

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

ANEXOS

Anexo A

A-1. Montaje del sistema de cultivo a escala de laboratorio



A-2. Cuantificación de lípidos mediante el método estándar Soxhlet

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

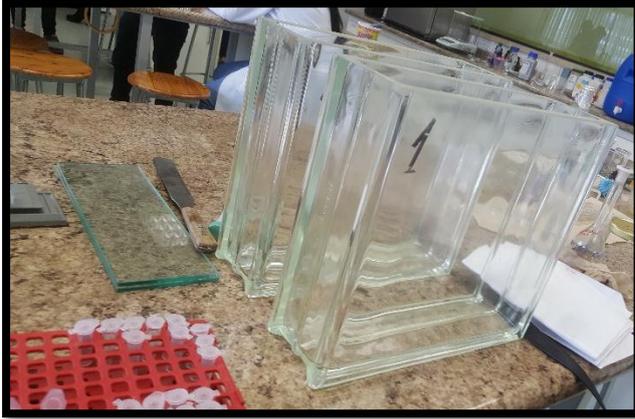


A-3. Recuperación del solvente mediante destilación y pesaje del matraz con grasa



A-4. Cromatografía en capa fina T.L.C

EVALUACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGAS DE LA LAGUNA LIMONCOCHA COMO MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES



A-4. Cuantificación de proteínas mediante electroforesis

