

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA ESCUELA DE BIOLOGÍA

23 de junio 2013

Proyecto de investigación

Selección de cepa de microalgas para la producción de
aceites como fuente de Biocombustibles y otros derivados

Informe final:

MSc. Maritza Guerrero Barrantes

MSc. Paola Solera Steller

MSc. Mario Araya Marchena

2013

Cuadro de Contenidos

Sección	Página
Tabla de contenidos	1
Información General del proyecto	2
Resumen	4
Palabras clave	5
1. Introducción	5-6
1.1 Objetivos Generales	7
1.2 Objetivos Específicos	7
2. Metodología	7
2.1 Colección, aislamiento y caracterización de las microalgas	7
2.2 Producción de biomasa de microalgas para la producción de lípidos y proteínas	7
2.3 Establecimiento de los medios de producción para la generación de lípidos en los sistemas cerrados (foto-biorreactores)	8
2.4 Diseño de fotobiorreactor	8
2.5 Extracción y cuantificación del aceite	8-9
2.6 Determinación de propiedades químicas	10
2.7 Análisis molecular de consorcio bacteriano asociado a los estanques	11-14
2.8 Diseño experimental	14
Resultados	15
3.1 Colección, aislamiento y caracterización de las microalgas	15
3.2 Producción de biomasa de microalgas para la producción de lípidos y proteínas	16
3.3 Establecimiento de los medios de producción para la generación de lípidos en los sistemas cerrados (foto-biorreactores)	17-23

3.4 Diseño de fotobiorreactor	25
3.4.1 Extracción y cuantificación del aceite	
3.4.2 Determinación de propiedades químicas	
3.5 Análisis molecular de consorcio bacteriano asociado a los estanques	26- 35
4 Otros logros	36-40
5 Discusión y conclusiones	40-43
6 Referencias	43-45

Título

Selección de cepa de microalgas para la producción de aceites como fuente de Biocombustibles y otros derivados

Autores y direcciones

MSc. Maritza Guerrero Barrantes mguerrero@itcr.ac.cr

MSc. Paola Solera Steller psolera@itcr.ac.cr

MSc Mario Araya Marchena mario.araya@itcr.ac.cr

Indicar nombre completo de los y las participantes del proyecto

MSc. Maritza Guerrero Barrantes Investigador (coordinador)

MSc. Paola Solera Steller Investigador

MSc. Mario Araya Marchena Investigador

Selección de cepa de microalgas para la producción de aceites como fuente de Biocombustibles y otros derivados

¹Guerrero Barrantes Maritza, ¹ Solera Steller Paola y ²Mario Araya Marchena

¹Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

²Centro de Química Ambiental (CEQIATEC)

Resumen

Las algas se componen de organismos acuáticos que capturan luz solar y el dióxido de carbono para hacer la foto-síntesis y así producir su energía, y además producir aceites vegetales que se pueden transformar en biodiesel. Las microalgas crecen favorablemente en los trópicos, ya que no necesitan para su cultivo controlado la aplicación de temperatura y luz, esto hace que su producción en sistemas abiertos tenga un costo bajo. Muchos de estos organismos, entre ellos las microalgas, permiten la exploración de sustancias y mecanismos poco dilucidados que pueden ser fuente de avance para la industria, resolviendo problemas relacionados con la salud, la nutrición o el impacto al ambiente. El objetivo de este proyecto era el de seleccionar e implementar procesos dirigidos al mejoramiento del cultivo de 3 o 4 especies de microalgas y la generación de biomasa con alto potencial para ser usado en la producción de biocombustibles y productos industriales como bio-fertilizantes. El desarrollo de una idea para un fotobiorreactor diseñado, construido e instalado para mejorar y escalar a un sistema abierto de producción; así como, la instalación de un laboratorio especializado en microalgas y la implementación de un algario ha sido un aporte sustancial para esta investigación. Los resultados obtenidos indican un aumento en la producción de biomasa y aceites en condiciones de medio heterotróficos, lo cual potencia la instalación de sistemas de producción de microalgas, asociados a la actividad acuícola. De igual manera, la presencia de consorcios microbianos juega un factor que estimula la estabilidad de los sistemas abiertos y de su productividad para intereses industriales. En conclusión este estudio revela con sus resultados de producción biomásica y de aceites así como la captura de CO₂ que las son microalgas una fuente importante de materia prima para la producción de biocombustibles, y contribuye atmosféricamente a equilibrar y ser carbono-neutral.

Palabras clave

Microalgas, cepas promisorias, aceites, *Chlorella sp*, *Haematococcus*, biodisel, fotobiorreactores, estanque.

1. Introducción

Históricamente, las microalgas han sido un grupo relacionado a la actividad humana en la medicina, la agricultura y la alimentación (Tomaselli 2007); sin embargo, la explotación de los cultivos de microalgas se ha establecido recientemente y es hasta el siglo veinte cuando se ha logrado tecnificar el manejo en sistemas comercialmente eficientes. Actualmente las microalgas se le relaciona con la biorremediación y la producción de sustancias de alto valor bioactivo (Chisti 2007), incluida la generación de fuentes de energía limpia (fuentes para la producción de aceites y de hidrógeno).

La problemática actual sobre el uso de los hidrocarburos como fuente básica de energía, ha generado la necesidad de una búsqueda de nuevas alternativas energéticas que garanticen un acceso continuo y un equilibrio económico, ecológico y social. Una de las alternativas más prometedoras es el uso de biomasa de origen vegetal, la cual es usada como materia prima del biodiesel y es una fuente de combustibles basada en procesos sustentables, renovables y amigables con el ambiente, que además posibiliten la captura de CO₂ (Rodolfi et al 2009, Song et al 2008). Una de las fuentes de biomasa con mayor potencial son las microalgas, las cuales alcanzan hasta una producción 300 veces superior al que se alcanza con soja y unas 25 veces al que se consiguen con palma.

Las microalgas son organismos acuáticos que capturan luz solar y el dióxido de carbono para hacer la fotosíntesis y, de esta manera, generar su energía; además de producir diferentes bioactivos que pueden ser empleados en la industria. Nuestro país, con casi el 5% de la biodiversidad mundial, se caracteriza por presentar una serie de parámetros ambientales constantes que permiten el desarrollo de sistemas abiertos de producción, empleando microalgas. Debido a las condiciones temperatura, humedad y luminosidad, estos procesos de generación de biomasa para la producción de aceites son más baratos y eficientes que en otras latitudes.

La confección de los sistemas semicerrados busca atender la necesidad de generar y disponer de un equipo indispensable para cultivar microalgas el cual no se encuentran en el país, y que además este tiene un costo muy elevado y con bajos volúmenes de producción algal. La producción algal promete ser la alternativa ambientalmente y económicamente más factibles que los combustibles fósiles (Gao y McKinley 1994; Reith et al 2005). Por otro lado, las algas tienen un bajo contenido de celulosa, lo que los convierte en un material adecuado para la degradación biológica (Horn 2000). Asimismo, las algas producen naturalmente aceite; alternativamente otras especies de algas que producen más carbohidratos y menos aceite, pueden ser procesados y fermentados para producir etanol.

En Costa Rica, el desarrollo de este tipo de sistemas de producción se encuentra a cargo del Instituto Tecnológico de Costa Rica y de la Universidad de Costa Rica. El fin de este proyecto era seleccionar e implementar procesos dirigidos al mejoramiento del cultivo de 3 o 4 especies de microalgas y la generación de biomasa con alto potencial para ser usado en la producción de biocombustibles y productos industriales como bio-fertilizantes, en un estanque cúbico. Para esto se realizaron colectas de diferentes grupos de microalgas de los sistemas acuáticos nacionales. Estos organismos fueron purificados y cultivados en condiciones de laboratorios en el Centro de Investigaciones en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y separados por su potencial lipídico. Se establecieron los sistemas de producción se incrementaron los volúmenes de biomasa y se determinó la composición química de los tratamientos durante el proceso.

Posteriormente, los sistemas de laboratorio fueron trasladados a fotobiorreactores y piletas cúbica y con inóculos con las diferentes microalgas previamente seleccionadas por su potencial lipídico. Se llevó un monitoreo constante para determinar los cambios en biomasa de acuerdo con el pH, temperatura, luz y nutrientes.

Con este proyecto se estimula un trabajo en conjunto entre dos instituciones de educación superior del país, para lograr un ligamen fuerte entre investigación y fuentes alternativas de tecnología y con esto estimular una mayor apertura de nuevas posibilidades de desarrollo en el país.

1.1 Objetivo general:

Seleccionar e implementar procesos dirigidos al mejoramiento del cultivo de 3 o 4 especies de microalgas y la generación de biomasa con alto potencial para ser usado en la producción de biocombustibles y productos industriales como bio-fertilizantes.

1.2 Objetivos específicos

1. Identificar a nivel de especies microalgas que se logren aislar de diferentes cuerpos de agua dulce y salada.
2. Establecer en condiciones unialgales cultivos de 3 o 4 especies de microalgas.
3. Establecer los medios de producción de 3 o 4 especies de microalgas para la generación de lípidos en los sistemas cerrados (foto-biorreactores).
4. Análisis preliminar de la composición y cantidad de lípidos y proteínas de las cepas de las microalgas con mayor potencial y que presenten mejores condiciones de producción.

2. Metodología

2.1 Colección, aislamiento y caracterización de las microalgas: Se colectó e identificó algunas especies de microalgas de diferentes cuerpos de agua del país (varias ubicaciones en Guanacaste (Cañas, Liberia, Filadelfia, Upala, Bebedero), Guápiles, San Carlos (Santa Clara), Cartago, Quepos. Se tomaron tres repeticiones de agua de cada sitio muestreado y se procedió a aplicar la técnica de dilución de las muestras utilizando diferentes medios de cultivo: líquido y en agar hasta obtener cultivos unialgales. Estos se mantienen en condiciones de laboratorio a 28 °C y a 800 luxes, con 12 horas luz y 12 horas oscuridad, con agitación constante.

2.2 Producción de biomasa de microalgas para la producción de lípidos y proteínas: De las cepas aisladas y debidamente identificadas, se sometieron a un crecimiento escalado en condiciones de laboratorio con el propósito de producir suficiente inóculo para iniciar con la extracción de lípidos, analizar su composición desde el punto de vista químico y la cantidad producida. Este escalamiento se realizó Erlenmeyer, contenedores de 4 litros a una temperatura constante de 28 °C e iluminados a una intensidad lumínica de 60-70 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$,

con 12 horas luz y 12 horas oscuridad. La tasa de crecimiento se determinó midiendo el incremento de la biomasa (mg peso seco L⁻¹d⁻¹) y la tasa de crecimiento se calculó a partir del incremento de la densidad del cultivo durante la fase de crecimiento exponencial.

2.3 Establecimiento de los medios de producción para la generación de lípidos en los sistemas cerrados (foto-biorreactores)

A partir de la cepa purificada y establecida de *Chlorella sp* se inició la evaluación del proceso de producción en condiciones de sistemas cerrados (foto-biorreactor de 300L). Se procedió con el establecimiento de los inóculos más adecuados bajo condiciones de producción. Se midió de la biomasa generada (mg peso seco * L⁻¹*d⁻¹) a partir de la fase de exponencial del crecimiento.

La cepa de *Chlorella* se sometió a diferentes tipos de estrés nutricional en medios de origen orgánico, extracto de pescado, hidropónico y a diferentes concentraciones de N-P-K con el objetivo de determinar biomasa obtenida (mg peso seco * L⁻¹*d⁻¹) y la relación en peso seco vs concentraciones lipídicas. Cada tratamiento fue escalado a un volumen de 4000 mL, todas las mediciones se realizaron durante periodos de 15 días.

2.4 Diseño del fotobiorreactor

El diseño del fotobiorreactor se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de la Escuela de Diseño Industrial.

El prototipo se llevó a cabo tomando en cuenta el material, la forma, peso y ergonomía, así como el sistema de llenado del estanque. Se implementó un sistema de iluminación alrededor del mismo.

Todo el diseño y funcionamiento del este sistema fue considerado bajo los premisa de que prestara un servicio eficiente y a bajo costo de producción.

2.5 Extracción y cuantificación del aceite:

Para la extracción y cuantificación del aceite generado en los sistemas de producción se emplearon dos métodos:

Método 1

De la muestra de microalgas se toman 50 ml, los cuales se transfieren a un tubo de centrífuga. Se centrifuga durante 10 minutos a 4000 rpm y el agua supernatante se elimina por decantación, dejando el pelet de microalgas, el cual se seca al vacío durante 3 horas. Se obtiene el peso seco de microalgas y se procede a realizar la extracción. El pelet de microalgas se pone a agitar durante 20 minutos en 50 ml de una mezcla cloroformo-metanol 2:1. Se separa por decantación la mezcla de disolventes, se seca utilizando sulfato de sodio, se trasfiere a un balón pre-pesado y se evaporan los disolventes en un rota-vapor. Se obtiene la masa de aceite por diferencia. Evaluación de las propiedades y calidad del aceite.

Método 2

La determinación de la cantidad de aceites se realizó mediante el protocolo de extracción con solvente químico, para ello las muestras se colocan en baño ultrasónico para durante una hora o bien en el equipo de ultrasonido para volúmenes mayores, seguidamente, en embudos separadores, se agrega 50ml de hexano como solvente orgánico por cada 200ml de muestra, además se adiciona alrededor de 5ml de HCL para evitar emulsiones. Las fases orgánicas recuperadas se secan con sulfato de sodio y se obtienen en balones tarados para su posterior tratamiento en rotavapor durante 15 minutos. Trascurrido este tiempo se colocan las muestras 10 minutos en la estufa a 70°C, y finalmente se obtiene a masa de aceites.

La fase acuosa sobrante se filtra y se seca en la estufa a fin de obtener la biomasa en peso seco de la muestra. Además se toma una segunda muestra y se filtra para la determinación de biomasa sin realizar la extracción del aceite. Relacionando ambos datos se obtiene que cerca del 34% de la producción total de biomasa, corresponda a lípidos obtenidos durante la extracción.

2.6 Determinación de propiedades químicas

Se determinó las propiedades de “Flash point”, viscosidad cinemática, índice de cetanos, número de ácido (ácidos grasos libres), estabilidad ante oxidación. Se utilizó la metodología y procedimientos planteados por la American Standard Methods (ASTM) y se comparó con los límites permitidos para el 100% Biodiesel (B100).

Se ha desarrollado distintos protocolos para la determinación de aceites en el medio de cultivo, los cuales se sigue el procedimiento básico de la extracción con solvente, con la variante de que se eliminan las microalgas por centrifugación y filtrado, bajo tratamientos con y sin ultrasonificar.

CO₂ capturado en cultivos de *Chlorella sp*

Para determinar la cantidad de CO₂ capturado en los cultivos microalgales se calculó la masa molar de la celulosa (C₆H₁₀O₅)_n (n=200) y de los átomos en molécula de celulosa (n=200) para conseguir la masa por átomo. Con esta información se calcula el porcentaje de la masa de Carbono (C).

Cada muestra cultivo microalgal se sometió a centrifugación, se filtró y se llevó a peso seco a 30 °C por 8 horas. Una vez obtenido la masa se pesa para calcular el CO₂ capturado durante el cultivo.



Fig.1: Procedimiento de extracción y secado de biomasa microalgal.

2.7 Análisis molecular de consorcio bacteriano asociado a los estanques

Para determinar las relaciones que existen en condiciones naturales entre microalgas y bacterias se visitó la empresa acuícola Aquacorporación Internacional S.A., ubicada en Cañas, Guanacaste, se realizó el muestreo de un consorcio microbiológico de diferentes estanques del sistema de producción de tilapia de esta compañía. Se llevó a cabo en 6 sistemas acuáticos productivos (estanques) que contienen microalgas, uno con producción de aceites y una planta de tratamiento de desechos sólidos (harina de pescado). En cada estanque se colectó tres muestras de 940ml a una profundidad de 10 a 15 cm, donde se observaron las microalgas superficiales. También se realizó mediciones de temperatura, pH y conductividad. Posteriormente, los frascos se almacenaron a 4°C y se trasladaron a los laboratorios del CIB.

Se realizó la detección molecular de comunidades microbianas presentes en sistemas acuáticos productivos mediante la técnica de PCR y se realizó una electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)

Extracción de ADN genómico: Las muestras de agua de cada uno de los estanques, se filtró un volumen de 150ml de agua a través de papeles filtros del tamaño de 0,20 micras (μm), el filtro recogió las células representativas del total de las comunidades microbianas in situ. Posteriormente los filtros se almacenaron a una temperatura de -70°C hasta realizar la extracción de ADN (Fig.2). Para la extracción de los ácidos nucleicos de los filtros, se cortaron en pedazos pequeños con tijeras quirúrgicas estériles los filtros y se introdujeron en etanol. El procedimiento de extracción de ADN se realizó utilizando el kit Power Soil de MO BIO Laboratories Inc, siguiendo las instrucciones de fabricante de este kit.

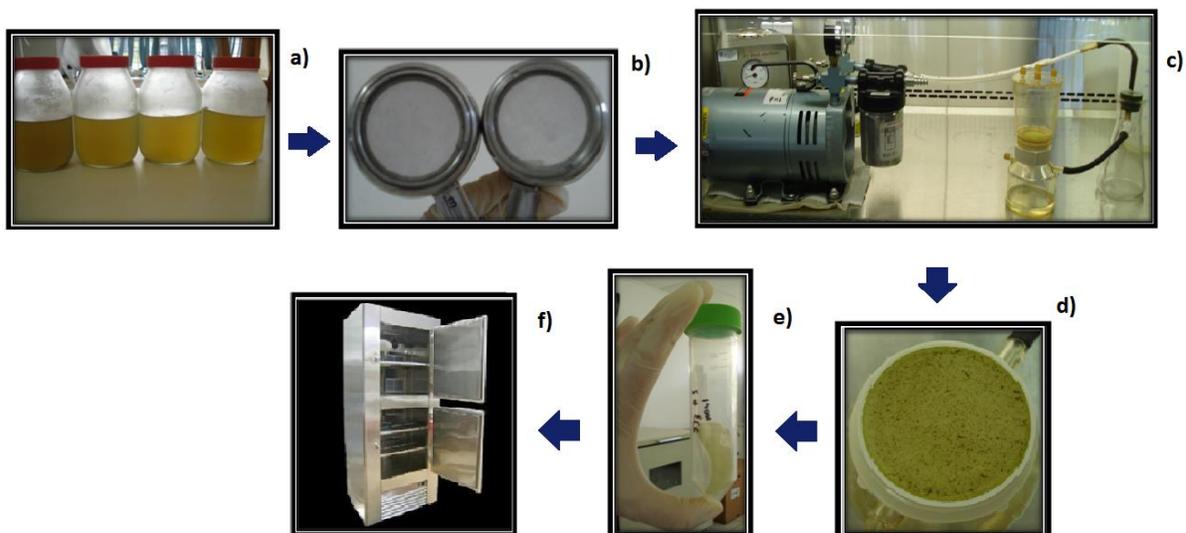


Figura 2. **a)** Frascos de Vidrio con 500ml de las muestras recolectadas. **b)** Coladores de distintos tamaños, izquierdo más grueso que el de la derecha. **c)** Equipo de Filtrado. **d)** Filtro con la muestra de comunidades microbianas. **e)** Tubo Falcón de 50ml con el filtro que contiene la muestra de comunidades microbianas. **f)** Cámara de congelamiento de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura, donde se almacenaron las muestras.

Se realizó el protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con imprimadores Universales GC-Clamp para bacterias: Para realizar la amplificación por PCR se conservó los reactivos y tubos de PCR en hielo.

Protocolo de PCR para Primers universales 341F-GC clamp y 534R para Dominio Bacteria y se trabajaron las soluciones de acuerdo a la Master Mix (Cuadro 1 y Cuadro 2).

Cuadro 1. Master Mix para comunidades bacterianas utilizando muestras de ADN de Aquacorporación S.A.

Reactivo	1 Reacción	32,5 Reacciones
Agua para PCR	31,7 μl	1030,25 μl
Buffer Dream Taq 10X	5 μl	162,5 μl
dNTPs (2 mM)	5 μl	162,5 μl
Imprimador 341F-GC (10 μM)	1,5 μl	48,75 μl
Imprimador 534R (10 μM)	1,5 μl	48,75 μl
Dream Taq polimerasa (5U/ μl)	0,3 μl	9,75 μl
TOTAL	45 μl	1462,5 μl

Luego se agregaron 5µl de ADN muestra, posteriormente para preparar el blanco de la reacción se le agregó 5µl de agua para PCR en lugar del ADN de la muestra siguiendo un Perfil térmico (Cuadro 2).

Cuadro 2. Perfil térmico para el uso de los primers GC-clamp (Touchdown PCR DGGE en el termociclador de la derecha).

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	45 seg	20
Alineamiento ^A	65 °C	45 seg	
Extensión	72 °C	2 min	
Desnaturalización	94°C	30 seg	20
Alineamiento	55 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	2 min	
Extensión Final	72 °C	10 min	1
Almacenamiento	4 °C	10 min	1
	10 °C	∞	1

^A La temperatura disminuye 0.5 °C cada nuevo ciclo.

Para evaluar la amplificación de los productos de PCR se elaboró una electroforesis en gel de 1,5% (m/v) agarosa en buffer TAE 1X, tiñéndolo con 1X GelRed, corriéndolo a 100V durante 40 minutos. Posteriormente, se observó la tinción del gel utilizando un transiluminador UVISAVE HD2.

Electroforesis de geles desnaturizante de gradiente (DGGE)

La técnica DGGE se realizó utilizando el equipo The Dcode Universal Mutation Detection System de BIO-RAD. Por lo tanto, estos productos de PCR obtenidos se corrieron en geles de poliacrilamida al 6%, con un rango de concentración desnaturizante del 20 a 70%. Posteriormente se cargó 10 µl de productos de PCR en el gel DGGE y se corrió a 100 V por 16 horas en buffer TAE 1X (40mM tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8.3) y a una temperatura de 60°C. Luego para obtener las bandas de ADN en los geles DGGE, se

extrajo el gel cuidadosamente y se colocó en una solución de GelRed 1X por 10 minutos. Finalmente, se observó la tinción del gel utilizando un transiluminador UVISAVE HD2.

2.8 Diseño experimental

Se realizó un análisis de descriptivas y un análisis de varianza de un factor de peso seco, número de células para los diferentes tratamientos (estrés nutricional, medio orgánico, extracto de pescado, hidropónico y a diferentes concentraciones de N-P-K). Se calculó la Cinética del crecimiento celular y la Biomasa ($\text{mg peso seco} * \text{L}^{-1} * \text{d}^{-1}$).

3. Resultados

3.1 Colección, aislamiento y caracterización de las microalgas:

Con las diversas colectas en Guanacaste (Cañas, Liberia, Filadelfia, Upala, Bebedero), Guápiles, San Carlos (Santa Clara), Cartago, Quepos, se logró purificar e identificar 5 especies de microalgas, algunos de los géneros como *Navícola*, *Haematococcus*, *Senedesmun* y *Pediastrum*, *Chlorella sp* (Figura 3 y Figura 4). Su identificación se encuentra en proceso de análisis molecular.

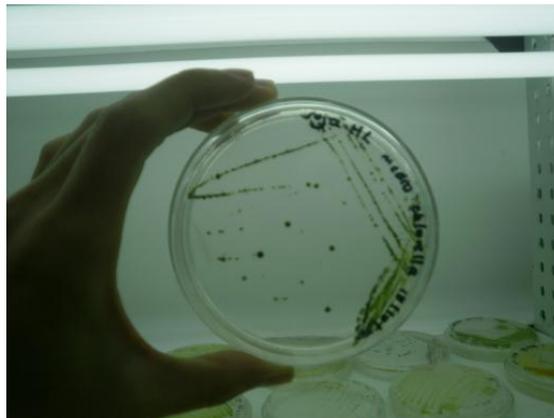
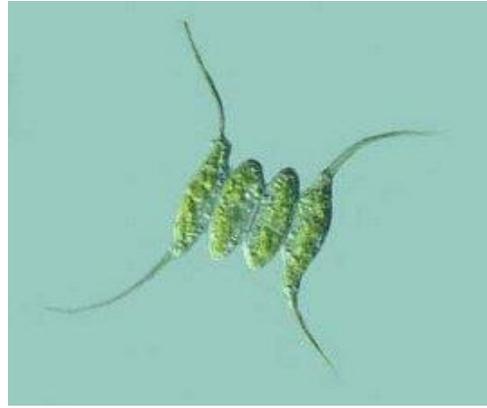


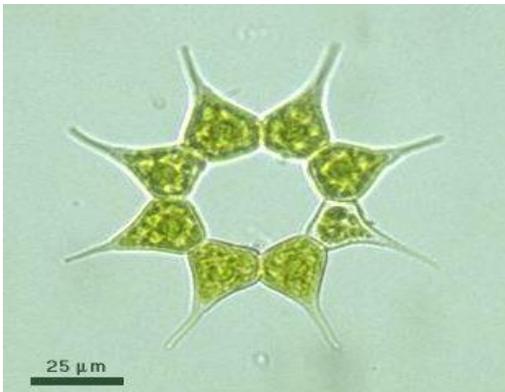
Figura 3. *Chlorella sp* en el algario del Centro de investigaciones en Biotecnología.



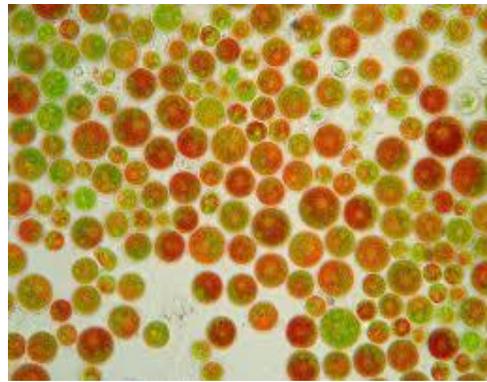
a- Navicola sp



b- Senedesmus sp



c- Pediastrum sp



d- Haematococcus

Figura 4. Imágenes de algunos de los géneros de microalgas presentes en el algario del Centro de investigaciones en Biotecnología.

3.2 Producción de biomasa de microalgas para la producción de lípidos y proteínas:

Los resultados de la curva de crecimiento de la microalga *Chlorella* sp, mostraron que de un inóculo inicial de 4×10^5 células por ml, se observó un incremento de 3×10^7 células/ml en 11 días. (Figura 5y 6). Se pudo determinar una concentración promedio de biomasa de $0,163(\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1})$ y un promedio de aceite de $0,02441(\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1})$. Así mismo, se estableció una curva de crecimiento de la cepa de *Chlorella* en estudio, en una relación inicial de inóculo de 50 ml de cultivo provenientes de un patrón de 15 días de edad con 200 ml de medio de cultivo y para un volumen total 250 ml (relación 1:5) se establece 4×10^5 células por ml.

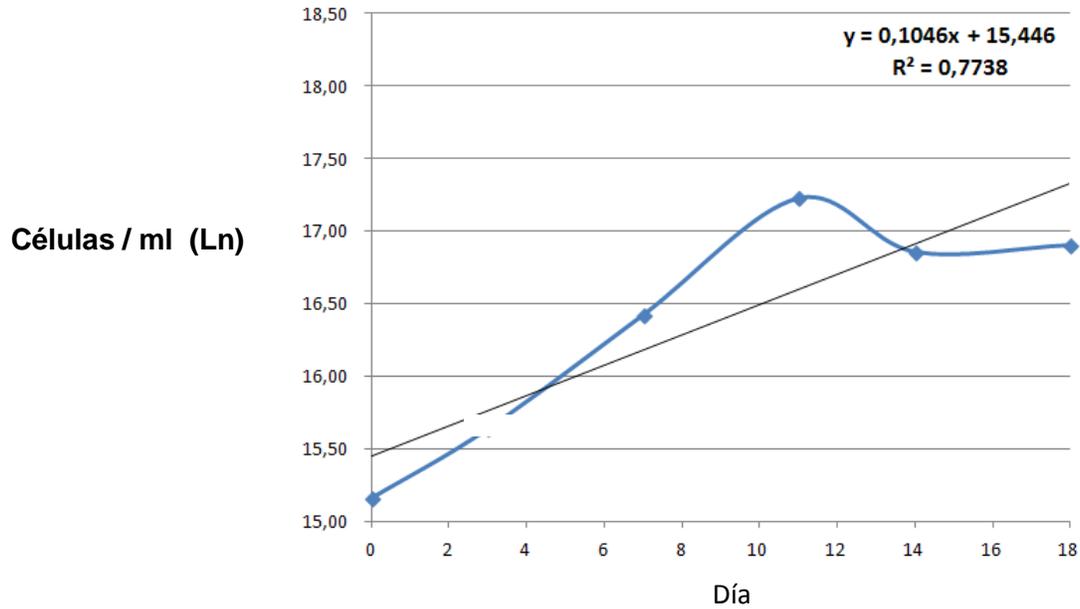


Figura 5. Curvas de crecimiento de *Chlorella sp.*, durante un periodo de 15 días. ITCR 2013.



Figura 6: Sistemas de cultivo de microalgas a diferentes escalas y tratamientos. ITCR, 2013.

3.3 Establecimiento de los medios de producción para la generación de lípidos en los sistemas cerrados (foto-biorreactores)

Los ensayos de la cinética de crecimiento demostró que en sistemas cerrados de 4 litros con medio orgánico (N-P-K 30-10-10) mixotrófico, tiene un aumento acelerado en el número de células por mililitros por día, llegando su crecimiento máximo en 8 días con $4,4 \times 10^7$ células/ml (Figura 7).

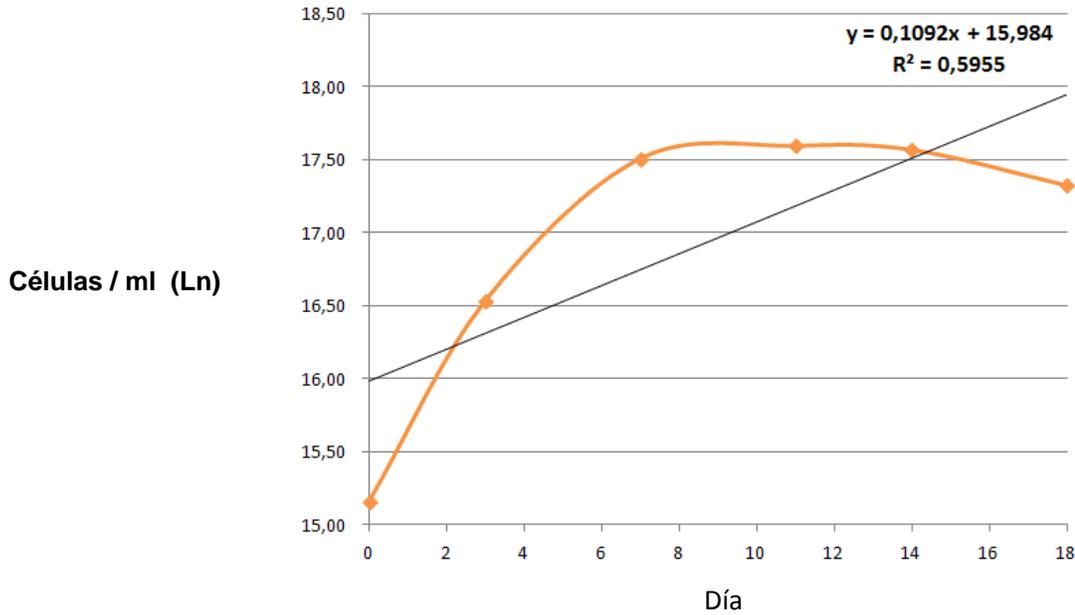


Figura 7. Curvas de crecimiento de *Chlorella sp* en medio orgánico, durante un periodo de 8 días. ITCR 2013.

El tratamiento con N-P-K 10-30-20 y el medio hidropónico mostraron los valores más altos para el crecimiento de biomasa 1,0306 g y 1,0054 respectivamente. Sin embargo, es el primero de los dos tratamientos el que muestra un mayor incremento en la concentración de aceite, con un valor 0,5992 g; así como una fijación de CO₂ de 0,41568 kg/m³.

Los tratamientos con N-P-K 10 30 20 y 20 20 20 y en el medio hidropónico los valores más altos de fijación de CO₂. Por otro lado, se determinó que hay mayor producción de aceites en el cultivo microalgal con medio 10 30 20, bajos en nitrógeno (Cuadro3).

Cuadro 3. Resultados de producción de biomasa y aceites de microalgas en cultivos autotróficos y mixotróficos en *Chlorella* sp.

Muestra	DATOS DE LABORATORIO			PROPORCIONES					PRODUCCION		FIJACIÓN DE CO2
	Días de cultivo	Días Reposo	Volumen (ml)	Aceite (g)	Biomasa Seca (g)	Aceite/Bio masa	Biomasa/ Volumen	Aceite/Volumen	Kg Aceite/m ³	Kg Biomasa/m ³	Masa de CO2 capturado (kg/m3)
10 30 20	37	15	4000	0,5992	1,0306	0,581	0,0003	0,0001	0,1498	0,2577	0,41568
10 50 10	37	15	4000	0,4193	0,8388	0,500	0,0002	0,0001	0,1048	0,2097	0,33832
20 20 20	37	15	4000	0,5620	1,0342	0,543	0,000	0,0001	0,1405	0,2586	0,41713
30 10 10	37	14	4000	0,2950	0,4756	0,620	0,0001	0,0001	0,0738	0,1189	0,19183
Medio <i>Chlorella</i>	37	18	4000	0,5772	0,3428	1,684	0,0001	0,0001	0,1443	0,0857	0,13826
Medio hidropónico	37	15	4000	0,5770	1,0054	0,574	0,0003	0,0001	0,1443	0,2514	0,40551
<i>Chlorella</i> +tierra+sph	37	15	4000	0,5676	0,7052	0,805	0,0002	0,0001	0,1419	0,1763	0,28443
Caldo de Pescado	37	18	4000	0,4457	0,5296	0,842	0,0001	0,0001	0,1114	0,1324	0,21361
Caldo orgánico	37	14	4000	0,3511	0,9952	0,353	0,0002	0,0001	0,0878	0,2488	0,40140

El escalamiento de biomasa de *Chlorella* en el fotobiorreactor (300L), mostró un aumento en la densidad celular de 72×10^6 , en menor tiempo que el mostrado con otros cultivos de microalgas de menor volumen (Figura 8).

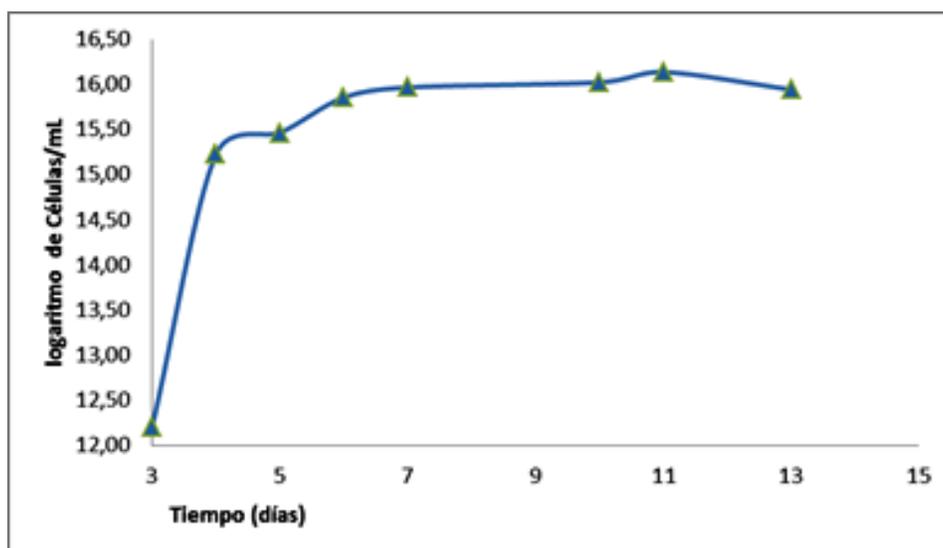
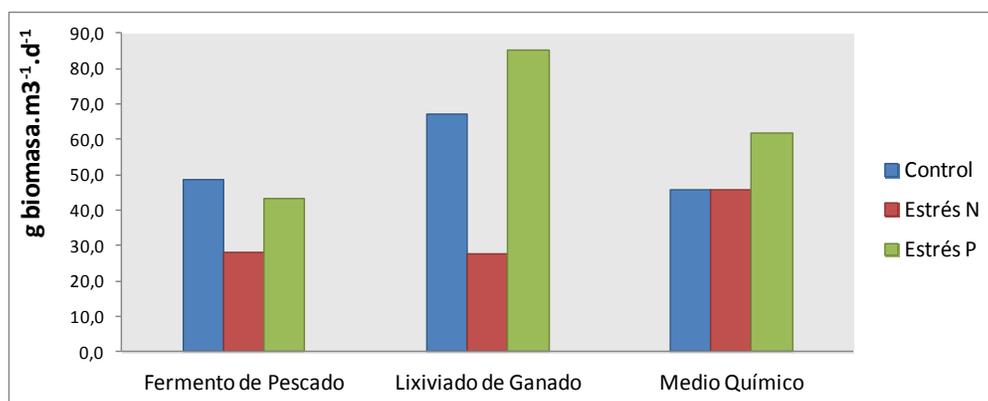


Figura 8. Curvas de crecimiento de *Chlorella* sp., durante un periodo de 15 días en condiciones de fotobiorreactor. ITCR 2013.

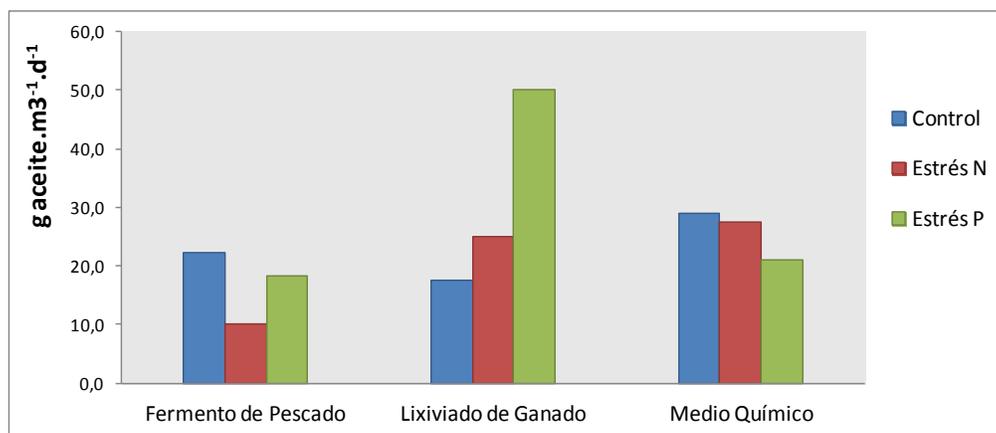
Condiciones de estrés

Los resultados de los tres tratamientos con *Clorella vulgaris* bajo estrés de nitrógeno reduce la biomasa producida, mientras que el cultivo microlagal con medio de lixiviado de ganado bajo estrés de fósforo fue el que alcanzó mayor biomasa (84 g m³/d-1) no así para los demás tratamientos aplicados (Fig. 9 a).

Los análisis de extracción de aceites para determinar el mejor tratamiento bajo estrés, indican que la mayor concentración se presentó en el tratamiento de lixiviado de ganado sin fósforo, 50 g de aceite m³d-1. (Figura 9 b).



a



b

Figura 9. Producción de biomasa (a) y de aceite (b) de *Chlorella vulgaris*, para tres tratamientos de cultivos orgánicos bajo estrés nutricional de nitrógeno y de fósforo

Los resultados bajo diferentes condiciones de estrés mostró que la máxima cantidad de lípidos producida se presentó en el cultivo con caldo orgánico sin fósforo, sin embargo se determinó que la mejor proporción de aceite/ biomasa promovida se dio en el tratamiento de caldo orgánico sin nitrógeno (Cuadro 5).

Según los cálculos obtenidos de mayor captura de CO₂ a partir de la mayor biomasa seca producida son logrados por los tratamientos control bajo estrés de fósforo y en el hidropónico con estrés de nitrógeno (Cuadro4).

Cuadro 4. Cultivo microalgal de *Chlorella sp* bajo condición de estrés con medio orgánicos, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2013.

	Volumen (ml)	Aceite (g)	Biomasa Seca (g)	Aceite/Biomasa	Biomasa/Volumen	Aceite/Volumen	Kg aceite/m ³	Kg Biomasa/m ³	Masa de CO ₂ capturado (Kg/m ³)
Control -N	4000	0,5496	0,3626	1,516	0,0001	0,0001	0,1374	0,0907	0,14625
Control -P	4000	0,4225	0,8160	0,518	0,0002	0,0001	0,1056	0,2040	0,32912
Caldo de Pescado -N	4000	0,1998	0,3662	0,546	0,0001	0,0000	0,0500	0,0916	0,14770
Caldo de pescado -P	4000	0,3681	0,4950	0,744	0,0001	0,0001	0,0920	0,1238	0,19965
Caldo Orgánico -N	4000	0,4976	0,0577	8,624	0,0000	0,0001	0,1244	0,0144	0,02327
Caldo Orgánico -P	4000	1,0010	0,7015	1,427	0,0002	0,0003	0,2503	0,1754	0,28294
30-10-10 -N	4000	0,2357	0,2610	0,903	0,0001	0,0001	0,0589	0,0653	0,10527
30-10-10 -P	4000	0,2426	0,2700	0,899	0,0001	0,0001	0,0607	0,0675	0,10890
20-20-20 -N	4000	0,3529	0,1401	2,519	0,0000	0,0001	0,0882	0,0350	0,05651
20-20-20 -P	4000	0,0490	0,0428	1,145	0,0000	0,0000	0,0123	0,0107	0,01726
Hidropónico -N	4000	0,7832	0,8976	0,873	0,0002	0,0002	0,1958	0,2244	0,36203
Hidropónico -P	4000	0,4897	0,7543	0,649	0,0002	0,0001	0,1224	0,1886	0,30423

3.4 Extracción y cuantificación del aceite:

Los análisis del calor de combustión demostraron que el aceite de microalgas es muy similar al de otros aceites. Las características que presentan los aceites de Canola y la Soya son muy similares a los que exhiben las microalgas (Cuadro 5).

Cuadro 5: Determinación de Calor de combustión del aceite microalgal de Química, Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos CEQIATEC, 2010.

Fuente	Calor de Combustión (kJ/g)	Viscosidad
Canola	38.52	38
Soya	38.30	33
Palma	38.37	26
Microalgas	38.72	36.6
Diesel	43.60	2.6

CO₂ capturado en cultivos de *Chlorella sp*

Los ensayos de incremento biomásico de microalgas en condiciones autotróficas se obtuvo una producción de 14,1 Kg/m³ (Cuadro 6) en un período de 22 días.

Cuadro 6. Datos de masa de microalgas en el cultivo del laboratorio.

Volumen de medio	22	ml
Masa del filtro	0,1006	g
Masa filtro húmedo + microalgas	1,3139	g
Masa filtro seco + microalgas	0,4108	g
Masa de microalga seca	0,3102	g

Los análisis de determinación de CO₂ a partir de la biomasa seca de microalgas en medio comercial y en condiciones autotróficas captura 6,21 Kg/m³ d-1 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Estimación de porcentaje de carbono en la celulosa.

(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	átomos en molécula de celulosa (n=200)		Masa por átomo
C	6	1200	14400
H	10	2000	2000
O	5	1000	16000
Masa molar celulosa (n=200)			32400
% masa de Carbono (C)			44 %
Masa de carbono en la biomasa es	0,138		g
Masa de carbono por m ³	1,694		Kg/m ³ de C
Masa de CO ₂ capturado	6,21		Kg/m ³ de CO ₂

Tomando en consideración: si el 100% de la biomasa es celulosa

3.4 Diseño del fotobiorreactor

Para determinar el mejor modelo de escalamiento se diseñó un fotobiorreactor de 300 litros, se tomó en cuenta diversas características para su funcionamiento (Cuadro 8). Se puedan medir diversas variables de forma sencilla y es fácil de descargar, con sistema de iluminación de 800 lux (Figura 10). El fotobiorreactor se encuentra instalado con un sistema electrónico de medición y con descarga de CO₂ y O₂, de ácido –base y cuenta con un sistema de agitación interna. Los análisis realizados por los diseñadores tomaron en cuenta la manipulación, colocación ágil de los sensores, el material del tanque entre otras y permitió establecer un equipo con características que cumplen con los criterios específicos para el cultivo microalgal (Cuadro 8).

Cuadro 8: Estudio de los diversos sistemas que contiene un fotobiorreactor y la recomendación de los materias y así como la colocación de los mismos de acuerdo con su ergonomía

Sistema	Recomendación	Función	Razón
Inundación	Difusores	Llenar el tanque con el medio (microalgas)	Evitar los choques violentos entre ellas mismas y contra superficies. La combinación del CO ₂ con los nutrientes para la eficiencia de la producción de microalgas.
Difusores CO ₂	Placas Circulares	Llenar el tanque con burbujas de CO ₂ . Llenar el tanque con la mezcla de nutrientes y microalgas	Material no corrosible. Fácil de dar mantenimiento. Hay diferentes modelos en el mercado. Elegir el óptimo según la forma del sistema y las sustancias con las que va a estar en contacto
Movimiento	Paletas/Un solo eje	Mantener el movimiento constante del medio. Garantizar la distribución homogénea de o ₂ y otros nutrientes en toda la mezcla	No genere centrífuga. Bordes redondeados. Mínimo impacto para las algas. Inoxidable. Difícil de corroer. Se recomienda un solo eje ya que colocar más de un molino en forma paralela, genera movimiento en “8”, esto genera choques entre las microalgas. También se desea evitar el efecto de centrífuga que eleva abruptamente las microalgas y puede provocar ligamientos
Luz	LED HO (High output)	Proporcionar los luxes necesarios para que se pueda realizar la fotosíntesis	No genere calor. Genere más de 1000 lx. Poco energético. Que no irradie rayos UV
	Fibra óptica		Transmite la luz tal y como la trasmite su fuente, sin ninguna pérdida a través de la distancia. Sin embargo, es sumamente costosa y la cantidad necesaria es muy grande
Extracción	Electroválvulas	Evacuación de la biomasa una vez que ya ha llegado a su punto máximo de cultivo	Se puede controlar y programar el tiempo de apertura y el flujo que debe dejar pasar
Tanque	Acrílico Plexiglass	Contener las microalgas y los nutrientes. Mantener su condición de traslúcido para permitir el paso de la luz de una manera eficiente. Resistir a la	Material resistente y fuerte liviano, resistente a rayos UV económico (por las condiciones del proyecto) el policarbonato, es 200 veces más liviano que el vidrio y el doble de resistente a la intemperie, a golpes y al ataque de ácidos; sin embargo, se “amarillentan” con el tiempo, y se corroen fácilmente con los químicos y pigmentos utilizados

		intemperie y a sustancias corrosivas	
Estructural	Acero Inoxidable	Soportar el sistema en si junto con el peso máximo que alcanzan las microalgas en su punto más denso	Tiene resistencia alta a grandes cargas. Maleable. Resistente a sustancias corrosivas.

El diseño establecido es de forma rectangular elaborado en Acrílico Plexiglass, con un sistema simple de llave de paso que se opera manualmente, y para el vaciado se decidió utilizar una electroválvula de salida controlada. En el sistema de movimiento se utiliza un sistema tipo molino que no daña las microalgas pero que, mantiene el sistema dinámico sin sedimentación celular. La iluminación es de 800 lux controlables para evitar la fotoinhibición, y cuenta con un panel de control de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (Fig. 10).

La microalga *Chlorella* se escaló en el fotobiorreactor a 300 litros y con un inóculo inicial de $2,7 \times 10^6$ células por un período de un mes.



Figura 10. Fotobiorreactor en el laboratorio de microalgas del CIB.

3.5 Análisis molecular de consorcio bacteriano asociado a los estanques

Los resultados obtenidos del consorcio microbiológico asociado a microalgas en los estanques de tilapias, determinó que la presencia de huellas genéticas de estas comunidades en cada uno de los puntos de estudios, con bandas predominantes que sugieren la presencia de mayor número de individuos de ciertas especies.

Extracción de ADN

Una representación de la electroforesis en un gel de agarosa al 1%, que forma parte de los resultados de las extracciones ADN genómico tanto del dominio Bacteria como del Dominio Eukarya, donde se evidencia la presencia de bandas, mostrando lo exitosa que fue la extracción en la gran mayoría de las muestras procesadas utilizando el kit Power Soil de MO BIO Laboratories Inc. A diferencia de la mayoría de las muestras, las extracciones de ADN obtenidas de la Entrada General (G) presentaron bandas muy débiles (Figura 11 y 12).

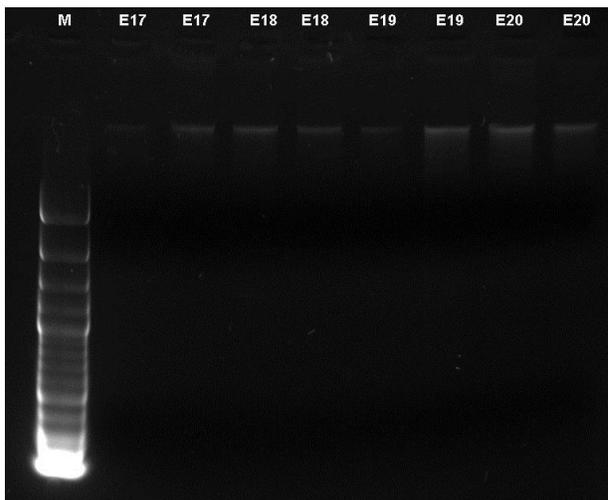


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN genómico de comunidades microbianas de la muestra de Salida general de Santa Paula humedales, los cuales están codificados de la siguiente manera E17, E18, E19 y E20, para el dominio Bacteria y para el dominio Eukarya.

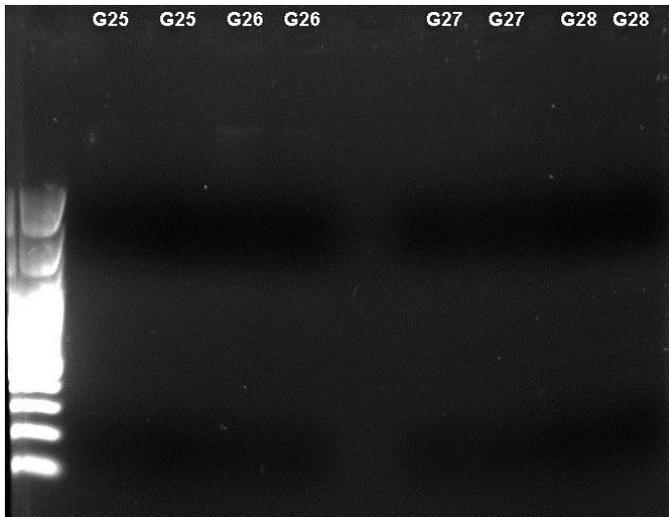


Figura12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN genómico de comunidades microbianas de la muestra de Entrada General de los estanques, los cuales están codificados de la siguiente manera G25, G26 G27 y G28, tanto para el dominio Bacteria como para el dominio Eukarya.

PCR Bacteria

Los resultados de los productos de PCR evidencian una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, donde se verificó que el perfil de bandas de ADN se amplificaron positivamente utilizando el par de imprimadores 341F-GC(CCTACGGGAGGCAGCAGCGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCA CGGGGGG) y el 534R (ATTACCGCGGCTGCTGG), que son específicos para ADNr 16 del dominio Bacteria. Indicando que el ADNr 16S de las muestras de comunidades microbiana acuáticas que tienen un peso molecular de entre 190 a 200 pb. También se puede afirmar que el PCR fue totalmente satisfactorio, ya que el control de PCR no salió contaminado (Fig. 13).

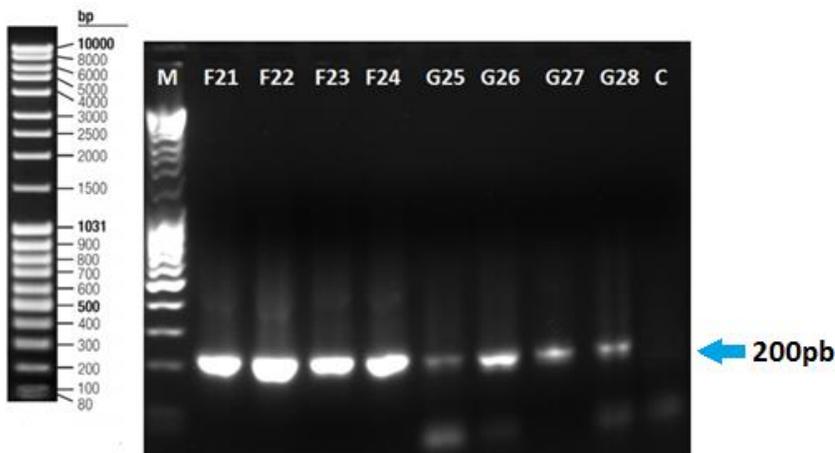


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR con imprimadores universales de Bacterias de la Planta de Harina y de la Entrada general de todos los estanques, los cuales están codificados como F22-F24 y G25-G28.

PCR Eukarya

Los resultados de los productos de PCR de las Eukarya, con una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, confirma que el perfil de bandas de ADN se amplificaron correctamente utilizando el par de cebadores universales GC-FUNG (CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCCATTCCCCGTTACC CGTTG) y el NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC), que son específicos para ADNr 18S del dominio Eukarya. Indicando que el ADNr 18S de las muestras de comunidades microbiana acuáticas que tienen un peso molecular de 320 a 370pb. También se puede afirmar que el PCR fue totalmente satisfactorio, ya que como se muestra en el último pozo, control de PCR, salió limpio y no contaminado (Fig. 14)

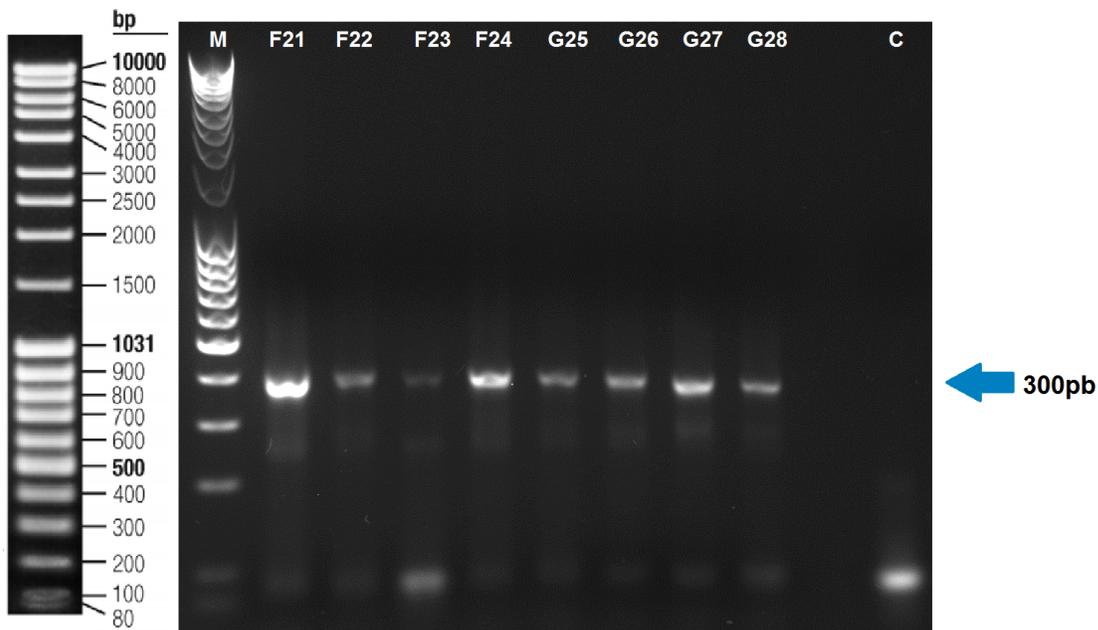


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR con imprimadores universales de Eukarya de la Planta de Harina y de la Entrada General de los estanques, los cuales están codificados como F22-F24 y G25-G28.

DGGE Bacteria

Se pudo determinar la representación de las comunidades bacterianas de todos los puntos de estudio, donde las bandas de la A1, A2, A3 y la A4 fueron las mismas, estableciendo una huella genética de la diversidad bacteriana de estanque 410 (A), así como las muestras

de la B5 a la B8 del estanque 425 (B), de la C9 a la C12 del estanque 533 (C) y de la D13 a la D16 del estanque 546 (D). Del mismo modo las muestras codificadas de la Salida General de todos los humedales (E) (E17 a la E20) obtuvieron las mismas bandas, igualmente para las muestras de la Planta de Tratamiento de Desechos Sólidos (Planta de Harina de la F21 a la F24). Por último las bandas de las muestras G25 a la G28, representaron las mismas comunidades bacterianas de la Entrada General de todos los estanques (E) (Figura 15 a y 15b).

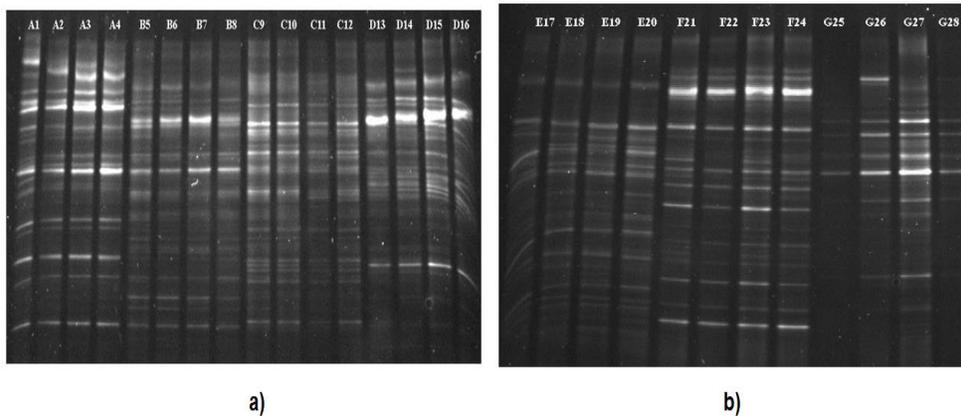


Figura 15. a) DGGE al 8% de poliacrilamida con las muestras del dominio Bacteria del estanque A1 al D16 de los puntos de estudio, se corrió a 65V durante 12h. b) DGGE al 8% de poliacrilamida con las muestras del dominio Bacteria de la E17 a la G28 de los puntos de estudio.

Se logró comprobar gráficamente la existencia de diversidad bacteriana en los diferentes estanques (A, B, C, D), así como en la Salida General de Santa Paula Humedales (E), la Planta de Tratamiento de desechos Sólidos (F) y en la Entrada General de los estanques (G). También evidenció la presencia de bandas dominantes que se repiten en otros puntos de estudio. Asimismo, este perfil gráfico mostró adecuadamente las bandas de ADN_r 16S, AS2, AS32, AS20, AS40, BS20, FS30, FS35 y GS14, fueron extraídas con cuidado utilizando luz ultravioleta, se escogieron de manera que las bandas fueran dominantes en las muestras y las que se observaron individuales (bien separadas). Luego se purificaron, reamplificaron por PCR y se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen Corp, en Maryland USA. (Figura 16).

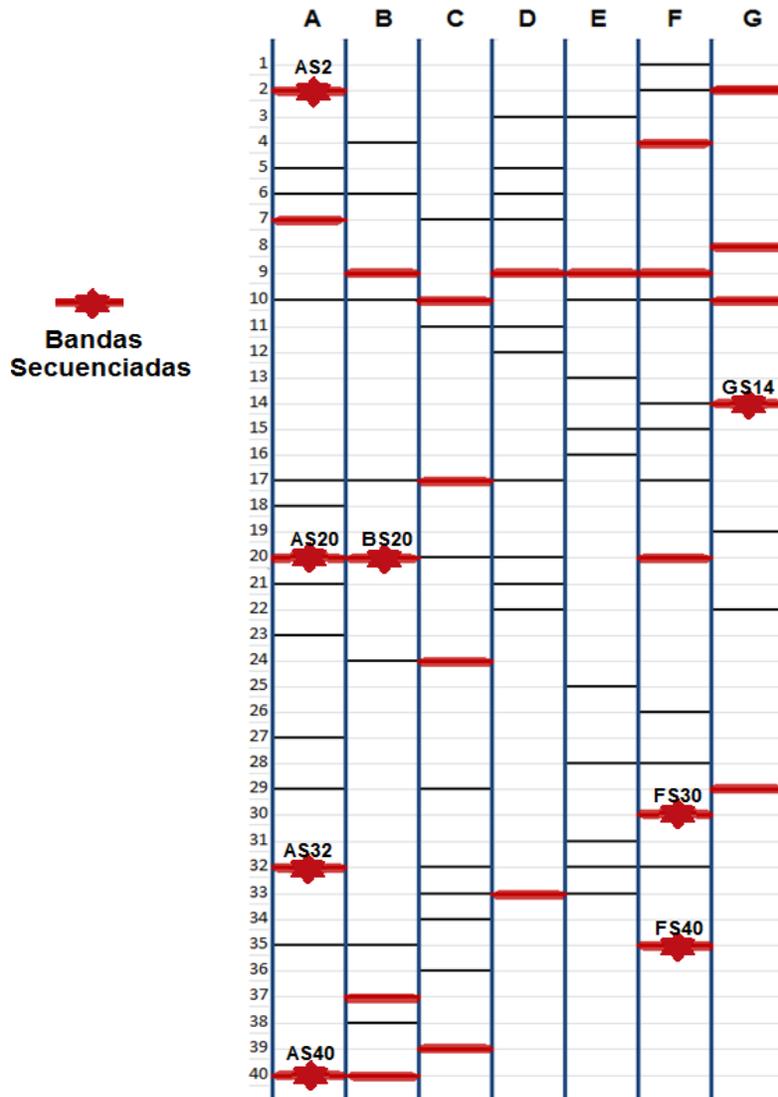


Figura 16. Perfil gráfico de las bandas de ADNr 16S muestreadas y secuenciadas de los 4 estanques de producción acuícola que se muestreó (A, B, C, D), de la Salida General Santa Paula Humedales (E), la Planta de Tratamiento de desechos Sólidos (F) y la Entrada General de todos los estanques (G) que se muestrearon.

DGGE Eukarya

Se pudo determinar la representación de las comunidades microbianas del dominio Eukarya, de todos los puntos de estudio, donde de la A1 a la A4 lo conforman las mismas bandas, estableciendo una huella genética del estanque 410 (A), así como las muestras de la B5 a la B8 del estanque 425 (B), de la C9 a la C12 del estanque 533 (C) y de la D13 a la D16 del estanque 546 (D). Las muestras codificadas de la Salida General de todos los humedales (E), la E17 a la E20 se obtuvieron las mismas bandas. Igualmente para las muestras de la Planta de Tratamiento de Desechos Sólidos (Planta de Harina) la F21 a la

F24 y por último las bandas de las muestras G25 a la G28, representan las mismas comunidades microbianas de la Entrada General de todos los estanques (E) (Figura 17a y 17b).

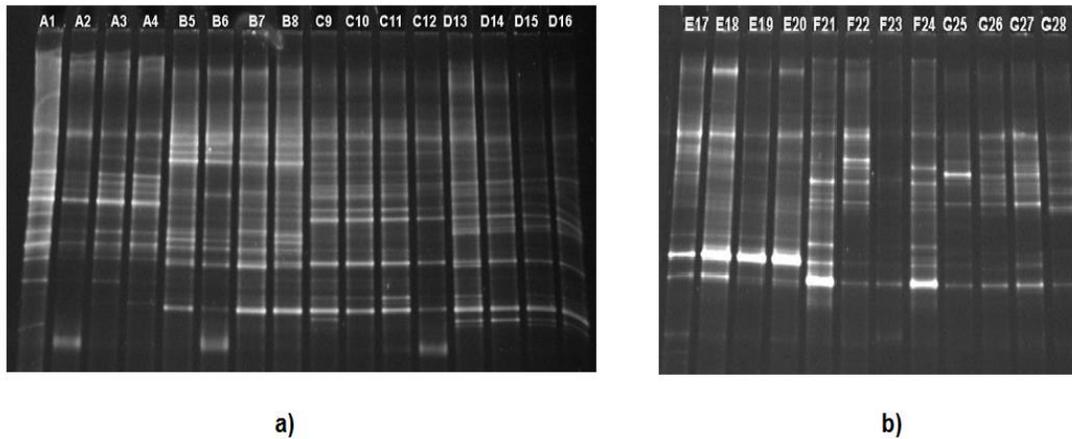


Figura 17. a) DGGE al 8% de poliacrilamida con las muestras del dominio Eukarya de la A1 a la D16 de los puntos de estudio, el cual se corrió a 65V durante 12h. b) DGGE al 8% de poliacrilamida con las muestras del dominio Eukarya de la E17 a la G28 de los puntos de estudio.

Se logró comprobar gráficamente la existencia de diversidad de los microorganismos del dominio Eukarya, en los diferentes estanques (A, B, C, D), así como en la Salida General de Santa Paula Humedales (E), la Planta de Tratamiento de desechos Sólidos (F) y en la Entrada General de los estanques (G). Además se pudo diferenciar bandas de ADN eucariota que fueron dominantes y que se repetían en los diferentes puntos de estudio. Asimismo, este perfil grafico mostró adecuadamente las bandas de ADNr 18S, BS4, CS6, ES11 y C10, que fueron extraídas con cuidado utilizando luz ultravioleta. Estas se escogieron de manera que las bandas fueron dominantes en las muestras y que se observaron individuales (bien separadas). Luego se purificaron, reamplificaron por PCR y se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen Corp, en Maryland USA. (Figura 18).

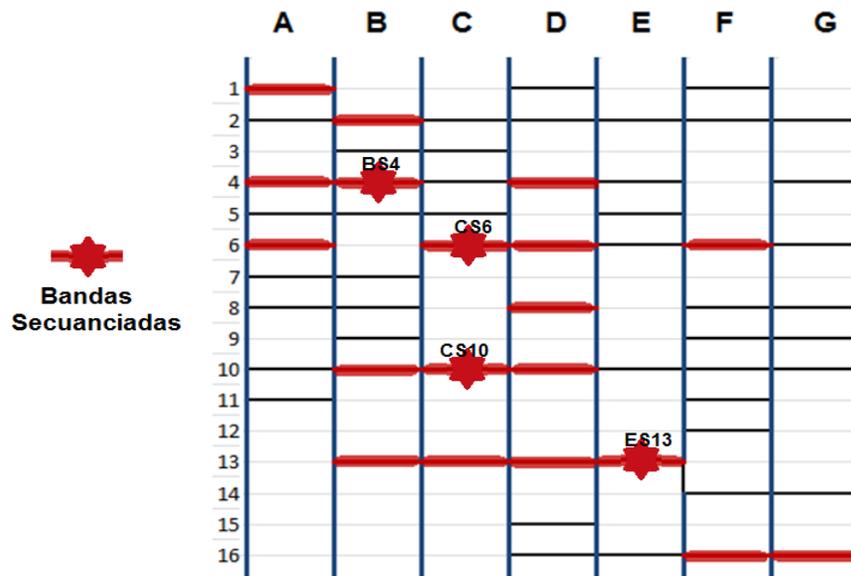


Figura 18. Perfil gráfico de las bandas de ADN bandas de ADNr 18S muestreadas y secuenciadas de los 4 estanques de producción acuícola que se muestrearon (A, B, C, D), de la Salida General Santa Paula Humedales (E), la Planta de Tratamiento de desechos Sólidos (F) y la Entrada General de todos los estanques (G) que se muestreó.

Análisis de los patrones de bandas de DGGE

Los patrones de bandas obtenidos por DGGE fueron agrupados por medio del método UPGMA (Unweighted Pair-group Method Using an Arithmetic Average) para la construcción de árboles filogenético moleculares. Los dendogramas obtenidos para bacterias y eucariotas respectivamente fue elaborado usando el coeficiente de similitud Dice (Sneath & Sokal, 1973) (Figuras 19 y 20)

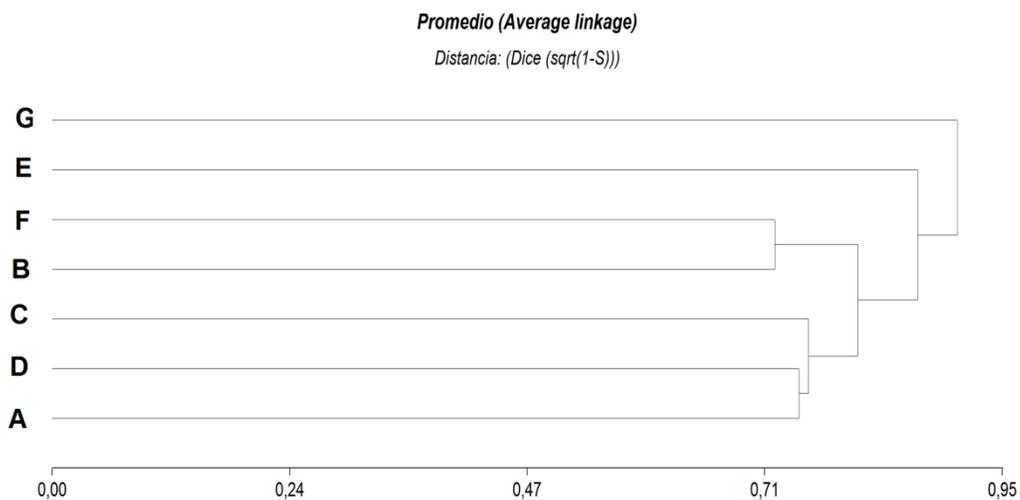


Figura 19. Dendograma de los ADNr 16S de los estanques de Tilapia, Salida General de Santa Paula Humedales y la Planta de Tratamiento de Desechos Sólidos. Datos generados a partir del coeficiente Dice, de software estadístico InfoStat.

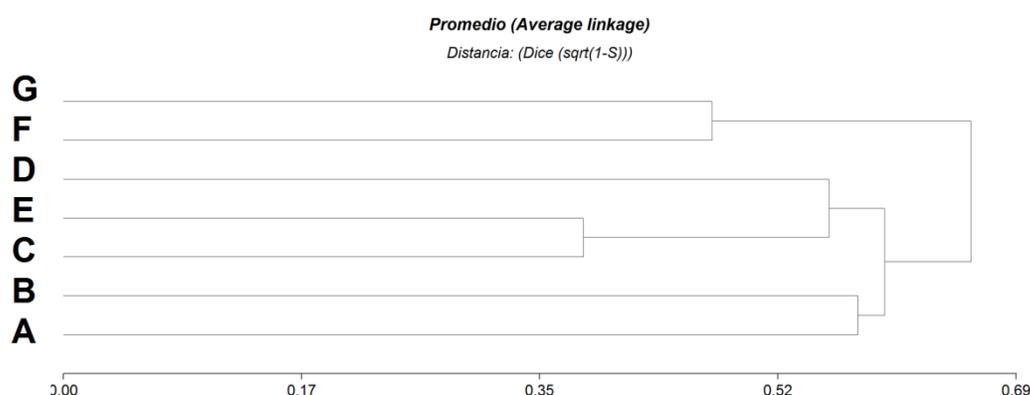


Figura 20. Dendograma de los ADNr 18S de los estanques de Tilapia, Salida General de Santa Paula Humedales y la Planta de Tratamiento de Desechos Sólidos. Datos generados a partir del coeficiente Dice, de software estadístico InfoStat.

Análisis de las secuencias de bandas de DGGE

Dominio Bacteria

Después de la secuenciación de las bandas de ADNr 16S, que se extrajeron del DGGE, se realizó una búsqueda de secuencias similares en la base de datos de ácidos nucleicos del GenBank a través del programa en línea BLAST. Las genoespecies bacterianas dominantes más cercanas que se identificaron de acuerdo a su porcentaje de similitud (Cuadro 8).

Cuadro 8. Parientes más cercano de las secuencias de ADNr 16S que se identificaron en base de datos GenBank por medio de un BLAST.

DOMINIO BACTERIA			
Banda	No. Accesoión	Organismo más cercano	Identidad (%)
AS2	JQ687101.1	- Flavobacterium sp. UKS19.	100
	HE663651.1	- Bacteria no cultivada clon VCC-19.	100
	HE857574.1	- Bacteria no cultivada clon LLEBRETA_H9.	100

AS32	GQ324225.1,	- Bacteria no cultivada Rhodocyclaceae clon 2-7.	93
	EU552860.1	- Bacteria no cultivada clon FLSED29.	93
	HE648204.1	- Bacteria no cultivada Rhodobacter sp.	98
AS20	JX105405.1	- Bacteria no cultivada banda 8-1 aislada de DGGE.	93
	JN941819.1	- Bacteria no cultivada clon Nan66.	99
	JX391871.1	- Bacteria no cultivada Microcystis sp. clon W1_ASTS73.	99
AS40	JX105420.1	- Bacteria no cultivada banda 9-8 aislada de un DGGE.	98
	JX575912.1	- Bacteria no cultivada Methylobacteriaceae bacterium clon b8-191.	100
	HE984358.1	- Roseomonas sp. JC162.	100
FS30	FN423884.1	- Bacteria no cultivada Conexibacter sp. clon GF1-9.	99
	GU056099.1	- Bacteria no cultivada clon DGS2-22	98
	JX011163.1	- Bacteria no cultivada actinobacterium clon D76.	97
FS35	JQ305080.1	- Bacteria no cultivada clon S74.	98
	HQ386512.1	- Bacteria no cultivada Fibrobacteres clon LiUU-9-151.	98
	JN371385.1	- Bacteria no cultivada Bacteroidetes clon A3-35.	97
BS20	JX105405.1	- Bacteria no cultivada bada aislada 8-1 de DGGE.	94
	AM409816.1	- Bacteria no cultivada bacterium clon d0-18.	99
	JX391871.1	- Bacteria no cultivada Microcystis sp. clon W1_ASTS73.	99
GS14	FJ718105.1	- Bacteria no cultivada Bacteroidetes bacterium clon IG2H12.	96
	EU641827.1	- Bacteria no cultivada Flexibacteraceae bacterium clon GC6m-2-57.	96
	JN866282.1	- Bacteria no cultivada Arcicella sp. clon B3_30_013.	96

Dominio Eukarya

Después de la secuenciación de las bandas de ADNr 18S, que se extrajeron del DGGE, se realizó una búsqueda de secuencias similares en la base de datos de ácidos nucleicos del GenBank, a través del programa en línea BLAST. Las genoespecies dominantes del dominio Eukarya más cercanas que se identificaron de acuerdo a su porcentaje de similitud (Cuadro 9)

Cuadro 9. Parientes más cercano de las secuencias de ADNr 18S que se identificaron en base de datos GenBank por medio de un BLAST.

DOMINIO EUKARYA			
Banda	No. Accesoión	Organismo más cercano	Identidad (%)
BS4	AY749614.1	-Sphaerastrum fockii	90
	AY749490.1	-Eucariota no cultivada clon H20.6	90
	EF023872.1	-Eucariota no cultivada Sarcosomataceae clon Amb_18S_1324	90
CS6	AY919776.1	-Eucariota de agua dulce no cultivada clon LG26-08	97
	JQ756501.1	-Eucariota no cultivada clon MG100929_41	97
	AB370100.1	- Pythium ultimum UZ085-10	96
ES13	AY553969.1	-Anodontites trapezialis	95
	AM774475.1	-Margaritifera margaritifera	91
	AF120537.1	-Lampsilis cardium	91
CS10	DQ297711.1	-Notommata cordonell	99
	DQ297704.1	-Lindia torulosa	99
	DQ297693.1	-Cephalodella forficula	99

3.6 Otros logros

Se logró la instalación y equipamiento de un laboratorio de microalgas, junto con un sistema de producción interno con flujo de CO₂ y O₂ para alimentar los cultivos de 4000ml, un sistema de iluminación especial alcanzando 9000 lux, un sistema de aguas “ultrapura” con filtro ultravioleta y carbón activado, para alimentar el fotobiorreactor y la remodelación del invernadero de microalgas.

Se logra instalar un fotobiorreactor totalmente diseñado por las Escuelas de Biología, diseño Industrial y la Escuela de Electrónica, con prácticas y tesis de estudiantes del ITCR. Este modelo es original y un modelo que puede ser replicable en otros laboratorios.

Se realizaron varios trabajos estudiantiles, trabajos finales de graduación y tesis de licenciatura.

Título de las tesis involucradas en el proyecto	Nombre de los/las estudiantes	Disciplina	Grado
Sistema de adquisición de variables físicas para un fotobiorreactor de cultivo de microalgas.	Juan Manuel Sánchez Corrales	Ingeniería Electrónica	Licenciatura
Sistema de monitoreo (fotobiorreactor) para la investigación y experimentación en el cultivo de microalgas	Yendry Rosales Solano Luis Felipe Rojas Rodríguez	Ingeniería en Diseño Industrial	Bachillerato
Estudio de factibilidad: Comercialización de biodiesel a base de microalgas	Dixie Espinoza Vargas, Joselyn Hernández Gutiérrez,	Ing. En Administración de Negocios	Proyecto estudiantil

	Wendy Jiménez Jiménez, Carolina Mora Faerron, Jerelyn Román Muñoz, Kandra Solano Serrano.		
<i>Extracción de variedades de Chlorella sp. en diferentes sistemas acuáticos de Costa Rica,</i> proyecto adscrito a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR.	Karol Arias Valverde y Nanday May Studt.	Biotecnología	Proyecto estudiantil
Detención molecular de comunidades microbianas en sistemas de producción acuícolas	Rossy Guillen Watson	Biotecnología	Tesis de Licenciatura

Títulos de las ponencias y participación en eventos, lugar y fechas:

-Presentación Canal 9. Producción de biocombustible con microalgas. Junio 2012. M. Guerrero. ITCR

-Entrevista para Radio Monumental, para el Programa ImpactoTec. Uso de microalgas para generación de combustibles. Setiembre 2012. M. Guerrero. ITCR

-Presentación en canal 13: “Selección de cepas de microalgas para la producción de lípidos como fuente de combustibles y otros productos derivados”. ITCR.

InformaTEC 2012. Investigación sobre microalgas para biocombustibles, Marzo, # 320, págs.9

III Congreso Latinoamericano SOLABIAA. Biotecnología al Servicio de la Sociedad, David, Chiriquí, República de Panamá. 40 horas, abril 2013. Asistencia. Kattia Núñez M.

III Congreso Latinoamericano SOLABIAA. Biotecnología al Servicio de la Sociedad, David, Chiriquí, República de Panamá. 40 horas, abril 2013. Asistencia. Gabriel Rodríguez C.

III Congreso Latinoamericano SOLABIAA. Biotecnología al Servicio de la Sociedad, David, Chiriquí, República de Panamá. 40 horas, abril 2013. Asistencia. Didier Mena

III Congreso Latinoamericano SOLABIAA. Biotecnología al Servicio de la Sociedad, David, Chiriquí, República de Panamá. 40 horas, abril 2013. Asistencia. Olman Gómez.

III Congreso Latinoamericano SOLABIAA. Biotecnología al Servicio de la Sociedad, David, Chiriquí, República de Panamá. 40 horas, Abril 2013. Selección de cepa de microalgas para la producción de aceites como fuente de Biocombustibles y otros derivados. **Ponente.** MSc. Maritza Guerrero, Mario Araya, Arys Carrasquilla y Paola Solera. 40 Horas.

III Congreso Latinoamericano SOLABIAA. Biotecnología al Servicio de la Sociedad, David, Chiriquí, República de Panamá. 10 horas, abril 2013. **Asistencia. Pre-congreso** MSc. Maritza Guerrero.

-Forum IBEROEKA-CYTED, Energía, Cancún México, 22 y 23 de noviembre del 2010. “Selección de cepas de microalgas para la producción de lípidos como fuente de combustibles y otros productos derivados”.

-Seminario: Financiamiento de proyectos de Eficiencia Energética y Energías Renovables, realizado por Alemania, Banco Popular, 2011 ITCR.

-Exposición de Ciencia y Tecnología en Costa Rica, 4, 5 y 6 de Agosto del 2011. “Selección de cepas de microalgas para la producción de lípidos como fuente de combustibles y otros productos derivados”. ITCR.

El ITCR ganó en conjunto con diversos países la propuesta CYTED 2012 SOCIEDAD IBERO-AMERICANA DE ALGOLOGÍA APLICADA, donde implica intercambio académico entre los países participantes. El objetivo de la sociedad es contribuir con la identificación, desarrollo y intercambio de conocimientos técnico-científicos multidisciplinares actualmente dispersos y sin masa crítica en la región Ibero- Americana para impulsar la sostenibilidad económica y ambiental de las fábricas de algas, la extracción e comercialización de productos de las mismas (energía, antioxidantes, pigmentos, etc.), el secuestro de carbono y la depuración de aguas residuales, generando al mismo tiempo un capital humano altamente especializado, generar nuevos negocios y polos de desarrollo local

-Charla: “Selección de cepas de microalgas para la producción de lípidos como fuente de combustibles y otros productos derivados”. ITCR, Alternativas agro energéticas, SENARA. 2011 ITCR **Ponente**. MSc .Maritza Guerrero. Diciembre 2012

Charla “Cultivo de microalgas” SENARA, Cañas, Liberia. Julio 2011. **Ponente**. MSc. Maritza Guerrero.

Capacitación “Biomasa para la producción de Energía Renovable en actividades ligadas al Sector Agropecuario”. Charlas “**Producción de Biomasa a partir de microalgas**”. **Ponente**. MSc. Maritza Guerrero. Diciembre 2012, INA Liberia.

Se recibieron capacitaciones en el exterior:

-Curso Internacional: “Actualizaciones en Sistemas Productivos en Acuicultura: Bases Científicas y Tecnológicas” 12 al 31 de octubre 2009. Concepción, Chile. Curso Teórico-Práctico. Coordinador Camilo Werlinger. MSc. Paola Solera (Biología) y MSc. Andrés Sánchez (Química)

Curso Avanzado de Biotecnología algal – microalgal. Algoteca (ACOI) Departamento de Ciencias de vida de la Universidad de Coimbra, Portugal. 19- 23 de marzo 2012. Gabriel Rodríguez.

4. *Discusión y conclusiones*

Este proyecto permitió aislar cinco géneros de microalgas tales como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Haematococcus*, *Pediastrum* y *Navícola*, de diferentes tipos de cuerpos de agua salada y dulce. Contar con cepas algales permite extender las posibilidades de investigaciones e intercambios con otros centros y abrir las posibilidades de investigación para su uso y explotación a futuro. Son muchas las utilidades reportadas para estas especies tanto a nivel ecológico como potencial comercial, se reporta en *Chlorella* como fuente biomásica alimenticia, producción de luteína, aceites, en *Scenedesmus* se le reconoce en el tratamiento de obesidad, aceites, *Haematococcus* principalmente como fuente productora de Astaxantina (Garduño 2011).

El aislamiento y caracterización de las microalgas además del conocimiento de su fisiología, ciclo de vida, bioquímica, permiten establecer parámetros esenciales para mantener las especies por periodos extensos y seguros. Establecer la factibilidad biológica y sobre todo su contenido nutricional permitirá poder llevar el cultivo a niveles masivos de producción (Medina et al 2012). Contar con cepas propias, nativas y adaptadas a las diferentes zonas ofrece la posibilidad de generar cultivos masivos con mayor facilidad, ya que estas están ajustadas a las condiciones ambientales de los sitios colectados.

En el cultivo de microalgas se hace necesario el conocimiento de la cinética de crecimiento de cada especie en determinado volumen que es independientemente de la especie y el volumen al que es cultivada.

Este estudio permitió conocer la cinética de *Chlorella sp* y por consiguiente se logró determinar el tamaño del inóculo, tanto para medios estándares (autotróficos) como con medios orgánicos (mixotróficos) y se logró obtener un mayor rendimiento con los cultivos mixotróficos con un aumento de 9,5 veces la cantidad de biomasa fijada. Los resultados de estudios similares han demostrado valores muy cercanos en cuanto a la cantidad de biomasa producidas (Arwa et al 2012; Rodolfi et al, 2008; Jaramillo 2011) y la concentración de aceites encontrados en nuestro estudio (Liang et al 2009; Sánchez et al 2008).

Este estudio probó que los cultivos mixotróficos presentaron mayores rendimientos en producción biomásica que los autotróficos, y se precisó que a mayor biomasa menor cantidad de aceite se promueve y viceversa, cuando se produce menor biomasa la cantidad de los lípidos es mayor. Heredia (2010) evidenció en su estudio con *Chlorella protothecoides* que existe mayor rendimiento de producción de biomásica y de aceite en diferentes condiciones mixotróficas comparado a sistemas autotróficos (medios estándares y luz).

Esta investigación demostró que limitaciones de nitrógeno con medio 10 30 20 y con caldos orgánicos deficientes de nitrógeno producen mayor proporción de aceite/ biomasa, donde este último llega a alcanzar hasta una producción de un 40 % de aceites intraalgales. Weldy (2010) publicó que el contenido de lípidos celular bajo estrés de nitrógeno y luz osciló desde 16 hasta 44% (en peso) resultados semejantes a los obtenidos en este estudio. Por otro lado, estudios con estrés en salinidad han evidenciado que se tienen un efecto sobre el crecimiento de *Botryococcus braunii* y revela una reducción de la biomasa y el contenido total de proteínas, por a la disminución de la tasa de fotosíntesis, pero la principal diferencia, se observa en el perfil de ácidos grasos especialmente ácidos esteárico, linoleico, palmítico y oleico (Ranga et al., 2007).

Los aceites extraídos de microalgas demostraron que la viscosidad registrada tiene menor contenido de poli-insaturados que los de canola, lo que reduce la viscosidad del biodiesel y tiene la ventaja de producir menos fricción y menos depósitos en los motores. Los aceites altos en poliinsaturados tienden a tener menor oxidación, mayor estabilidad y un número de cetanos inferior (39 a 54) que otros aceites vegetales (45 a 70) (Veillette et al 2011).

Esta investigación revela que según los análisis de combustión del aceite de microalgas con valores inferiores (38.7 MJ/Kg) a los del biodiesel (43.6 MJ/Kg) permite lograr obtener un mayor rendimiento. Estudios semejantes señalan que las propiedades de los aceites microalgales son comparables al biodiesel convencional y cumplen con la norma de EE.UU. para Biodiesel (ASTM 6751) (Xiufeng et al 2007). Por tanto, el aceite producido por el ITCR puede ser utilizado como materia prima para producir biocombustible a futuro.

Los resultados del estudio de los consorcios microbianos de la compañía de producción de tilapia, Aquacorporación mostraron similitud en todos los sitios muestreados, indicando variabilidad en bacterias y algunos eucariotas como rotíferos. En un sistema abierto de producción se espera que la presencia de esta comunidad de organismos que incluye a las microalgas, aumenten la productividad de la dinámica del consorcio asociado (Avnimelech 2006; Nhan et al 2006), y generen las condiciones ideales para la producción de aceites y diferentes bioactivos de interés industrial.

La evidencia de los resultados muestra que el uso de medios de composición orgánica presenta un alto potencial para la implementación de los sistemas de producción para microalgas. La mayoría de los microorganismos juegan un rol importante en los sistemas productivos para tilapia, como degradadores de la materia orgánica o biocontroladores. Se concluye que la técnica de PCR-DGGE como tal es un método apropiado para la identificación de comunidades de microbianas en sistemas productivos acuícolas, donde se cultiva tilapia.

Los resultados obtenidos del cálculo de CO₂ capturado de los cultivos microalgales en condiciones autotrófica son valores muy altos en comparación con los resultados generados de los arboles (6,21 Kg/m³ d-1).

Según para compensar una emisión anual de 2 toneladas de CO₂ se necesitan sembrar por año: 10 árboles; tomando en cuenta lo siguiente:

“La compensación de un Árbol se basa en un árbol plantado en el trópico húmedo, absorbiendo **50 libras (22 kg) de emisiones de dióxido de carbono al año por 40 años - cada árbol absorbe 1 tonelada de CO₂ durante su vida útil.** Debido a la manera en que crecen y la competencia de recursos, algunos podrían morir o ser destruidos - no todos alcanzarán su pleno potencial de secuestro de carbono. Este cálculo asume que 5 árboles deben plantarse para garantizar que al menos uno viva **40 años** o que su secuestro combinado equivalga a 1 tonelada. (<http://www.calculatusemisiones.com/main.html> y <http://www.verdeopolis.com/CO2/>)

Si esta masa de CO₂ capturado fuera por día (6,21 Kg/m³*día) entonces por mes se estarían capturando: 186 Kg/m³*mes de CO₂; es decir: 2,2 toneladas/m³* año.

En conclusión este estudio revela con sus resultados de producción biomásica y de aceites así como la captura de CO₂ que las son microalgas una fuente importante de materia prima para la producción de biocombustibles, y contribuye atmosféricamente a equilibrar y ser carbono-neutral. En otras palabras, sustancialmente todo el carbono liberado en la combustión y / o fermentación se eliminó previamente de la atmósfera durante el crecimiento de algas contiene poco o nada de azufre.

5. Referencias

Avnimelech Y. 2006. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach *Aquacultural Engineering* 34: 172–178

Chisti, Yusuf. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biothechnology. Adv.* 25: 294-306.

Gao, K. y K. McKinley. 1993. Use of macroalgae for marine biomass production and CO₂ remediation: a review. *J. of App. Phycology*, 6(1): 45 - 60. Guardado, j. 2007. Tecnología del biogás. *Energía y tú. Cubasolar* No. 40,

Garduño S. G., Rodríguez P. M., Martínez G. M., Quintanar Z. R., Lozano R., C., Campos C. J., y Monsalvo R. A. C . 2011. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 2(2):67-80.

Heredia A. T, Wei W, Hu B 2010. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162(7): 1978-1995

Horn, S.J., Aasen, I.M. and Østgaard, K. 2000. Ethanol production from seaweed extract. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25: 1-6.

Jaramillo J. 2011. Evaluacion tecno-economica de la Produccion de biocombustibles a partir de microalgas

Medina J.A., Piña V.P., Nieves S. M., Arzola G.J., Guerrero I.M., 2012 La importancia de las microalgas. CONABIO. Biodiversitas, 103:1-5. ISSN: 1870-1760.

Liang Y., Sarkany N., Cui Y. 2009 Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Biotechnol Lett 31:1043–1049.

“Exponen sobre biocombustibles a partir de microalgas en la Universidad de Santiago de Chile”. Universia Noticia. 2009 on line <<http://noticias.universia.cl/vida-universitaria/noticia/2009/10/06/275735/exponen-biocombustibles-partir-microalgas-universidad-santiago-chile.html> > (2013).

Ranga R. A., Dayananda C., Sarada R., Shamala T.R., Ravishankar G.A. 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents Bioresource technology 98 (3), 560-564

Reith, J., E. Deurwaarder, K. H., Kamermans, W. B. & G. Zeeman. 2005. Bio-Offshore. Grootschalige teelt van zeewieren in combinatie met offshore windparken in de Noordzee. ECN Biomassa, A.P.W.M. Curvers, ECN Windenergie, WUR - Nederlands Instituut voor Visserijonderzoek / RIVO, Plant Research International, Lettinga Associates Foundation. Holanda. 137 p.

Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi, G., Del Bimbo, L., Fredici MR. 2008. The Green vall panel. Book of abstracts of the 11 th Internatiopnal Conference of Applied Phycologie 20-27. Galway, Ireland. P 93.

Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G & Tredici MR. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnol. Bioeng. 102: 100-112.

Sánchez T. J, Juscamaita M.H., Vargas C., Oliveros R.R. 2008. Medios enriquecidos con ensilado biológico de pescado. Ecología Aplicada. Lima, Perú. Vol 7(1,2) pp 149-158.

Song D, Fu J & Shi D. 2008. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chin. J. Biotech.* 24: 341-348.

Tomaselli, L. 2007. The Microalgal Cell, in *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (ed A. Richmond), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK

Veillette M., Chamoumi M., Faucheux N. and Heitz M., 2011 Microalgae-based Oil for Biodiesel Production. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 60: 787-790.

Weldy, C.S., Huesemann M. (2010). Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. U.S. Department of Energy Journal of Undergraduate Research, 115–122.

Xiufeng L., Han X., Qingyu W. 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 98: 764–771