

CULTIVO DE MICROALGAS AUTÓCTONAS A ESCALA DE LABORATORIO PARA PRODUCCIÓN DE ACEITES Y OBTENCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

S. M. da Silva, C. García, J. N. Fuentes Berazategui, J. Barón

Universidad Nacional de Cuyo-Facultad de Ingeniería

smdasilva@fing.uncu.edu.ar, carobeleng@gmail.com, fuentesberazategui@fing.uncu.edu.ar
jbaron@cediac.uncu.edu.ar

1. SINOPSIS

La crisis energética intensifica la búsqueda de alternativas económicas para la generación de energía, que estén asociadas a la protección del medio ambiente. En este contexto se ha estudiado la posibilidad de desarrollar un cultivo de un consorcio de microalgas autóctonas obtenidas de aguas residuales.

Las microalgas son conocidas por generar una gama de múltiples subproductos, como pigmentos, alimentos, fármacos y aceites, a partir de la utilización del anhídrido carbónico (principal gas responsable por el efecto invernadero) en su metabolismo.

En esta investigación se estudió el cultivo de un consorcio de microalgas autóctonas obtenidas de aguas residuales, en fotobioreactores abiertos con capacidad de 3L de volumen, con control de parámetros y en laboratorio. Los cultivos hechos en triplicado, consistieron de 2,5L de medio con una profundidad de lámina de agua de 10cm. Tales cultivos fueron sometidos a exposición a la luz de 12h, seguidos de 12h de oscuridad, durante 8 días. Los parámetros evaluados fueron: temperatura ambiental, pH, volumen de CO₂ inyectado, biomasa producida y contenido de aceites extraídos (lípidos totales). Los resultados indicaron que la producción de biomasa alcanza su valor máximo entre en 2° y 4° día después de iniciado el cultivo y los valores de lípidos extraídos variaron entre 23% y 53% del peso en seco. El pH varió entre 6,0 y 7,0 y las temperaturas oscilaron entre 18° C ($\pm 2^\circ$ C) y 34° C ($\pm 2^\circ$ C). Los datos obtenidos indicaron que es posible la obtención de aceites a partir de microalgas cultivadas en aguas residuales urbanas, con rendimientos de interés económico, utilizando consorcios de algas autóctonas.

A partir de estos experimentos se realizarán estudios complementarios tendientes al aislamiento de las cepas autóctonas del consorcio que sean las mejores productoras de aceites, así como estudios de sensibilidad a la exposición a luz natural y artificial, a diversos medios de cultivo y al uso de fuentes de CO₂ no comerciales (gas de chimenea).

2. INTRODUCCIÓN

Desde 1978, Estados Unidos está desarrollando un programa conocido como “Aquatic Species Program” que tiene como principal objetivo la producción de biodiesel a partir de microalgas creciendo en cultivo abierto, utilizando el anhídrido carbónico de plantas de usinas termoeléctricas. El programa obtuvo avances en la ciencia de la manipulación del metabolismo y de los sistemas de producción de microalgas. Los investigadores encontraron microalgas que producen una gran cantidad de aceites y que también son hábiles para crecer en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad [1].

Las aplicaciones productivas y comerciales de las microalgas son diversas como numerosas son las especies que integran este grupo de organismos. Sus usos van desde la producción de alimentos para consumo humano hasta las aplicaciones energéticas. Son la principal fuente natural de ciertos pigmentos altamente demandados en el mercado internacional, como el β - caroteno o la astaxantina [2]. Además tienen aplicación en la depuración de gases de combustión y en la depuración de aguas residuales. Comparadas con otras opciones biológicas para la captura y utilización del anhídrido carbónico emitido por usinas termoeléctricas u otras fuentes, los cultivos de microalgas tienen como ventajas el potencial para obtención de alta productividad de biomasa, la habilidad de capturar nutrientes de aguas residuales y el uso de aguas saladas y no apropiadas para otros fines [3].

Una de las primeras aplicaciones en desarrollarse fue el empleo de las microalgas en el tratamiento terciario de las aguas residuales urbanas. Por lo tanto, son organismos que actualmente son objeto de intensas investigaciones para la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas susceptibles de ser utilizadas en medicina o de nuevos usos productivos como la biorremediación ambiental o la elaboración de biocombustibles [4].

Las microalgas son una alternativa a otras fuentes de obtención de aceites como soja y maíz, porque al presentar un elevado porcentaje de lípidos, alcanzan una elevada producción por hectárea lo que reduce los costos de obtención del biocombustible [3]. Algunas especies de microalgas, como *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis* sp. son conocidas por presentar una buena productividad de aceites (33% y 29% respectivamente) y resistencia a contaminaciones y a otras variables ambientales normalmente perjudiciales a otras microalgas [1].

Con relación al cultivo de las microalgas, es necesario tener en cuenta la interrelación de varios factores, con control de parámetros básicos como los nutrientes presentes en el medio de cultivo a ser empleado. En cada caso habrá que estudiar los requerimientos particulares de la especie y de la variedad que se vaya a cultivar en las condiciones de cultivo que se van a utilizar en escala de laboratorio. Otro factor importante es la penetración de la luz en el cultivo; en los cultivos masivos la profundidad es tan grande que la intensidad de la luz incidente no es suficiente para la fotosíntesis, hasta el fondo del tanque. En los cultivos masivos a la intemperie la penetración de la luz es más efectiva, pero se debe reducir la intensidad de la luz, cubriendo estos estanques con una malla [5].

El fotoperíodo es un factor que regula la división celular, en diatomeas la reproducción asexual (división) ocurre durante el período de luz y éste es acelerado bajo iluminación continua. En contraste las especies formadoras de auxosporas (esporas sexuales), dan lugar a células del mismo tamaño y esto ocurre en el período de oscuridad. Por lo tanto, el período de iluminación puede ajustarse de acuerdo a los objetivos del cultivo: el fotoperíodo continuo (horas de iluminación prolongada) produce crecimientos rápidos, un fotoperíodo con horas de luz y oscuridad semejante al fotoperíodo solar mantiene un crecimiento normal y saludable. En cultivos a gran escala es recomendable la inyección de CO₂ (0,5%) para contribuir al proceso fotosintético [6].

Para muchas especies de Diatomeas la temperatura óptima oscila entre los 15 y 20°C y pocas especies de esta familia crecen a más de 28° C, en cambio las clorofíceas como *Chlorella saccharophila* cultivadas de manera masiva a la intemperie, pueden soportar temperaturas entre 12,5 – 30°C [7, 8].

Los cultivos de microalgas en laboratorio son generalmente desarrollados en fotobiorreactores diseñado para cultivos semicontínuos y empleados en cultivos experimentales [9]. La productividad volumétrica de la biomasa en fotobiorreactores puede ser hasta 13 veces superior a aquella obtenida en sistemas de tipo “raceway ponds”, debido a mejor posibilidad de control de los parámetros involucrados en el proceso productivo [1, 2].

Además del control de los parámetros mencionados es necesario considerar que para el establecimiento de un sistema de producción de microalgas es importante el dominio de las técnicas de aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas, así como el conocimiento de la fisiología, ciclo de vida, bioquímica, etc. de las especies, para determinar su factibilidad de cultivo y sobre todo su contenido de aceites, para poder llevarse a niveles masivos de producción [10].

3. DESARROLLO

Las características climáticas de la provincia Argentina de Mendoza, como la alta heliofanía y el clima seco con bajo índice de precipitaciones anuales, la hace muy propicia para el cultivo abierto de organismos fotosintéticos como microalgas de alto contenido lipídico.

Tomando en consideración el posible uso de aguas residuales y las condiciones climáticas de la región se planeó hacer el cultivo de microalgas y la obtención de biocombustible, sin procesos de esterilización y con empleo de cantidades reducidas de nutrientes adicionados a estos medios.

El presente trabajo tuvo como objetivo investigar la capacidad de crecimiento y producción de aceites por parte de un consorcio de microalgas autóctonas obtenidas de aguas residuales, cultivadas en condiciones similares a las encontradas en el medio ambiente (cultivo abierto). Para tal fin fueron empleados fotobiorreactores abiertos con capacidad de 3L de volumen, a los cuales les fueron adicionados 2,5L de aguas residuales, en las cuales se observó por microscopio la existencia de distintas especies de microalgas.

Los cultivos fueron hechos por triplicado, consistieron de 2,5L de medio con una profundidad de lámina de agua de 10cm. Tales cultivos fueron sometidos a exposición a la luz de 12h, seguidos de 12h de oscuridad, durante 8 días. Los parámetros evaluados fueron: temperatura ambiental, pH, volumen de CO₂ inyectado, biomasa producida y contenido de aceites extraídos (lípidos totales).

Todos los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico con el uso del programa Prism GraphPad 3.0.

Los microorganismos empleados fueron un consorcio de microalgas obtenido de aguas residuales. Para las microalgas aisladas de aguas residuales el medio de cultivo seleccionado fue el Medio Chu 10, modificado [11, 12], recomendado para microalgas de hábitat oligotróficos y eutróficos. La Tabla 1 presenta los nutrientes y sus concentraciones usadas en tal medio

Tabla 1. MEDIO CHU 10 (Modificado por Gerloff y Umebayashi)	
(Recomendado para aislamiento de microalgas de hábitats oligotróficos y eutróficos)	
Ca(NO ₃) ₂	0.04%
K ₂ HPO ₄	0.01%
Na ₂ CO ₃	0.02%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.025%
Na ₂ SiO ₃	0.025%
Citrato de Hierro Amoniacal	0.005%

El cultivo fue semicontinuo y desarrollado en triplicado, con fotoperíodos de 12h y con la inyección de anhídrido carbónico en concentración del 0,5 % y con salinidad inicial del medio del 3%. La salinidad elegida del 3% es comúnmente encontrada en el agua del mar y por lo tanto, los ensayos fueron hechos teniendo en cuenta la posibilidad del uso de grandes piscinas con agua del mar para cultivo abierto de las microalgas. Además, cuando, a mediano plazo, se usen aguas residuales provenientes de industrias de conserva, por ejemplo, que generalmente tienen un contenido salino, las microalgas ya estarían previamente adaptadas a este tipo de medio, lo que requeriría solamente ajustes de otras variables encontradas en tales medios [13, 14].

La profundidad del agua utilizada en las peceras fue de 10 cm y la fuente de luz se ubicó a 30 cm de los fotobiorreactores.

Se analizó el desarrollo de las microalgas en las temperaturas ambientales que variaron entre 18°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) y 34°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante el periodo estudiado (cultivo de verano). El anhídrido carbónico fue inoculado a partir de un tubo de 10L conectado por cánulas hasta las peceras y con válvula de control del flujo del gas. La tasa de gas inyectado fue de $0,32\text{m}^3/\text{h/L}$ de medio de cultivo, pero considerándose la poca solubilidad del gas, es probable que un alto porcentaje (más de 50%) no haya quedado en el medio, siendo el CO_2 mayormente obtenido de procesos fotosintéticos de las microalgas en su interrelación con las bacterias presentes en las aguas residuales.

La Figura 1 representa los fotobiorreactores, que son las peceras en las cuales se ha inyectado el anhídrido carbónico.



Figura 1. Fotobiorreactores con inyección de anhídrido carbónico

La tasa de evaporación observada, representada por el volumen diario de evaporación del medio, fue de 4,8%. La variación del pH fue medida a los 2, 4, 6 y 8 días de cultivo y los cambios en los valores obtenidos fueron influenciados por la temperatura ambiental y por la cantidad de anhídrido carbónico disuelto en el medio. Asimismo, no se observaron variaciones bruscas, manteniéndose el pH en rangos entre 6,00 y 7,00 como se representa en la Figura 2.

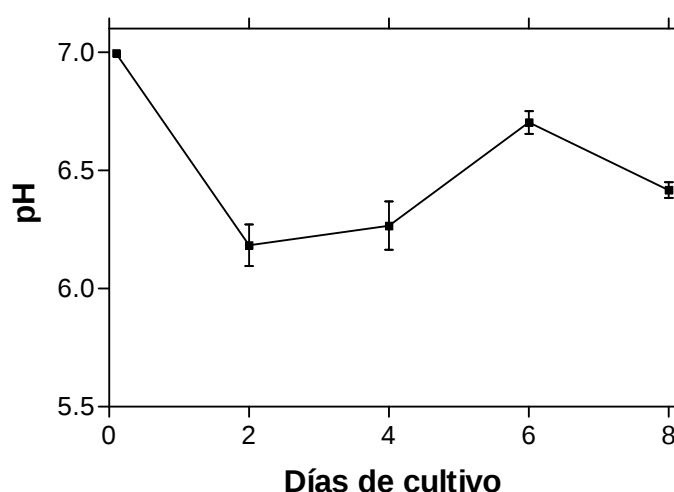


Figura 2. Variación del pH en el fotobiorreactor a los 2, 4, 6 y 8 días de desarrollo de las microalgas.

Para la determinación de la biomasa de microalgas producida al largo de los 8 días de cultivo, se sacaron muestras a cada 48h, tomando el tiempo cero como punto de partida de los análisis. El control (o tiempo cero) representó la biomasa inicial de microalgas presente en las aguas residuales y corresponde al “inoculo” de microalgas. La toma de muestras se hizo a partir de la retirada de 3 alícuotas de 10mL de cada fotobiorreactor en los días indicados. Las muestras fueron acondicionadas en frascos de vidrio de 12cm y llevadas a centrifuga por 30min., 3000rpm. El exceso de agua fue retirado por pipeta y posteriormente estas fueron llevadas a estufa de secado por 72h, a temperatura de 60°C, para evaporación del agua restante y obtención de la masa seca de microalgas.

Todos los tubos de vidrio que contenían la biomasa de microalgas fueron pesados; la diferencia entre el peso del vidrio obtenido antes de los análisis, y el peso del vidrio después del secado de las microalgas, determinó los valores de biomasa obtenidos. Tales valores fueron convertidos a “g.L⁻¹” como se representa en la Figura 3, donde se indica la evolución de la biomasa de microalgas a lo largo de los 8 días de cultivo.

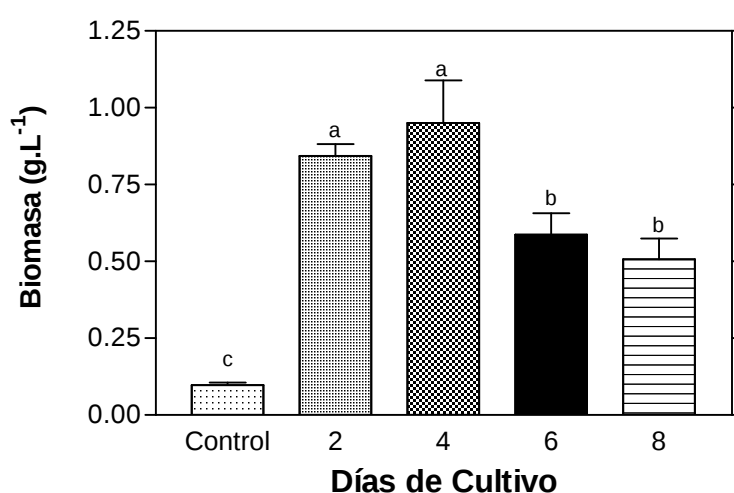


Figura 3. Producción de biomasa de microalgas en fotobiorreactor a los 2, 4, 6 y 8 días de desarrollo del cultivo.

El tiempo representado como control indica las condiciones iniciales del cultivo antes del agregado de nutrientes y del anhídrido carbónico, indicando la cantidad de biomasa preexistente que fue denominada “inoculo” y que se mantuvo en condiciones iniciales similares en los tres fotobiorreactores estudiados.

Los resultados observados indicaron que a los 2 días de cultivo se alcanzó una elevada productividad de biomasa de microalgas en las condiciones de cultivos estudiadas, correspondiente a valores superiores a 0,8 g.L⁻¹. Este valor creció levemente a los 4 días, para decaer a valores de biomasa levemente superiores a 0,5 g.L⁻¹ en los demás días de cultivo; verificándose que tales valores son semejantes a los encontrados en la literatura para en estudios en los cuales se emplearon cultivos de la microalga *Chlorella* sp. y donde se ha obtenido 0,48 g.L⁻¹ a los 2 días de cultivo [15, 16].

Posteriormente a la determinación de la biomasa, se llevaron las muestras previamente secadas en estufa, a un tratamiento químico para la obtención de los datos relativos a la producción de aceites en cada etapa de desarrollo del cultivo. Para la obtención de los datos del contenido graso de la biomasa de algas, se aplicó el prensado de la biomasa y la extracción por solvente, sendo el n-hexano el solvente utilizado para tal fin. Otras técnicas de extracción con el empleo de enzimas, liquefacción termoquímica y pirolisis están en investigación [13].

Para la realización del procedimiento de extracción por n-hexano, se aplicaron 2mL del solvente sobre el contenido de microalgas obtenido en cada frasco, previamente centrifugado y secado en estufa. Se hizo una mezcla de la biomasa con el solvente, con auxilio de un bastón de vidrio, para homogenizar la muestra y permitir la extracción del aceite con el solvente.

Luego se separó el solvente con el aceite de la biomasa residual, llevando tales muestras a la estufa de secado por 24h. Los tubos de vidrio, pesados anteriormente, fueron nuevamente pesados después de la evaporación del solvente, conteniendo solamente el aceite en cada tubo. Los resultados obtenidos por diferencia de peso, indicaron el porcentaje de aceites producidos en cada caso. En la Figura 4 se representan los datos de lípidos obtenidos y su correlación con la cantidad de biomasa (g.L^{-1}) producida a lo largo de los 8 días de cultivo de las microalgas en los 3 diferentes fotobiorreactores.

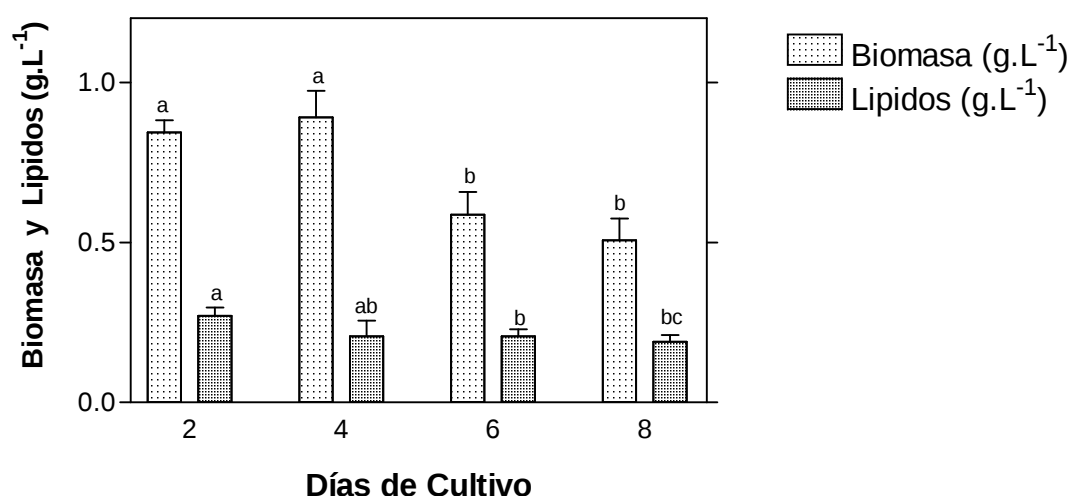


Figura 4. Correlación entre biomasa y lípidos obtenidos (g.L^{-1}) al largo de los 8 días de cultivo.

Los datos obtenidos indicaron que los valores máximos de biomasa fueron alcanzados en el segundo y en el cuarto día de desarrollo. Sin embargo, cuando se comparan los datos estadísticos de la biomasa y la producción de lípidos, se observa que las cantidades de lípidos obtenidas en el segundo día (superiores a $0,25 \text{ g.L}^{-1}$), son superiores a las obtenidas en los demás días, lo que indica que en dos días ya se alcanza un rendimiento que justifica que tales cultivos no sean llevados a plazos más largos de desarrollo. Todavía, hay que considerar que dado que todos los cultivos fueron abiertos y sometidos a las condiciones ambientales, pueden a lo largo de los días haber experimentado contaminaciones bacterianas y/o de otras microalgas lo que podría haber ocasionado resultados menos significativos en tales días. Proporcionalmente, en el sexto y octavo día de cultivo, hay menor producción de biomasa pero la cantidad de lípidos obtenidos es semejante a los valores obtenidos en los días anteriores.

4. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos indican que el consorcio de microalgas puede presentar una buena alternativa para el desarrollo de cultivos de microalgas, en la medida que asocia diferentes especies autóctonas, lo que genera un “stress” fisiológico, que puede favorecer la producción de aceites por las microalgas.

Los resultados logrados para biomasa (media de $0,8 \text{ g.L}^{-1}$), así como la producción de lípidos lograda, superiores a $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ a los dos días de cultivo, indicaron que es posible la obtención de

lípidos a partir de consorcio de microalgas autóctonas cultivadas en aguas residuales urbanas, con rendimientos de interés económico. Tales tipos de cultivo presentan también otras ventajas asociadas, como mejor resistencia a contaminaciones bacterianas y a contaminaciones originadas por la presencia de otras microalgas no deseables, frecuentes en las condiciones de cultivo abierto (piscinas al aire libre).

Otras fuentes de anhídrido carbónico (calderas) deben ser estudiados para que se tenga un conocimiento más detallado del proceso en cada tipo de cultivo.

Por ende, en lo que concierne al cultivo de microalgas, éstas pueden ser producidas en aguas salinas, residuales, en tierras infértiles y también permiten la fijación del anhídrido carbónico, contribuyendo a la reducción del efecto invernadero, tornándolas por lo tanto en candidatas promisorias como fuentes futuras de combustibles renovables. Al conjunto de ventajas que presenta el cultivo de microalgas, como productoras de aceites para la obtención de una fuente renovable de biocombustible, se suma su versatilidad y adaptabilidad a diferentes situaciones económicas y ambientales. Ahora bien, para que los resultados conseguidos puedan originar datos que contribuyan para la efectividad del proceso, se debe hacer en etapas futuras de investigación, el control de otros parámetros como luminosidad (lux), y el estudio y desarrollo de técnicas de aislamiento y purificación de las microalgas autóctonas mejor productores de biomasa y lípidos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Huntley M. E. & Redalje D. G. "CO₂ Mitigation and Renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal." *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* xxx:1-36, 2004.
- [2] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Advances*. 25:294-306, 2007.
- [3] Pérez Bañado, Homero. Biodiesel de Microalgas. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. 2007.
- [4] Papazi A., Makridis P., Divanach P. & Kotzabasis K. Bioenergetic changes in the microalgal photosynthetic apparatus by extremely high CO₂ concentrations induce an intense biomass production. *Physiol Plant*. 132: 338-49, 2008.
- [5] Coll Morales J., 1983. *Acuicultura: Marina Animal*. Mundi-Prensa, Madrid, p. 237–371.
- [6] Hirata H. Preliminary report on the photoperiodic acclimation for growth of *Chlorella* cells in synchronized culture. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima, Univ.* 24: 1–6, 1975.
- [7] Hirata H. & Murakoshi M. Effects of aeration volume on the growth of marine *Chlorella* in culture. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* 26 : 15–21, 1977.
- [8] Hirata H., Ushiro M. & I. Hirata. Ecological succession of *Chlorella saccharophila*, *Brachionus plicatilis* and autogenous bacteria in culture water. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 31: 153–160, 1982.
- [9] Aguirre M. A. Estudios con un cultivo semicontinuo de *Tetraselmis suecica* (Kylin, 1935), nutrientes, vitaminas, desinfección del medio con U.V. y producción del sistema a largo plazo. Tesis Esc. Sup. de Ciencias Marinas, U.A.B.C., 62 pp., 1981.

- [10] Torrentera B.L., 1983. Cultivo semicontinuo de *Chlorella saccharophila* Kruger. Tesis. Esc. Nal. est. Prof. iztacala, UNAM, pp. 68. México, D.F.
- [11] SISFFA. Cultivation of live food organisms in the Yashima Station I. Fertilizers for Marine Phytoplankton Culture. Saibai-gyogyo News, 3,4:1–8, 1964.
- [12] Chu S.P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. I. Methods and culture media. J.Ecol. 30: 284–325, 1942.
- [13] Umebayashi O. Practical culture of microalgae. In: Culture of Marine Life Textbook for Marine Research Course. Japan International Cooperation Agency, Government of Japan, 6: 131–144, 1975.
- [14] Illmann A. M., Scragg, A. H. & Shales S.W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. Enzyme and Microbiol Technology. 27: 631-635.
- [15] Frábegas J., Maseda A., Dominguez A. & Otero A. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. Changes under different irradiances in semicontinuous culture. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20: 31-35, 2004.
- [16] Chiu S.Y., Kao C.Y., Chen C.H., Kuan T.C., Ong S.C. & Lin C.S. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. Bioresour. Technol. 99: 3389-3396, 2008.
- [17] Xu F., Cai Z. L. , Cong W. & Ouyang. Growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis* sp. grown mixotrophically in fed-batch culture. Biotechnol Lett. 26:1319-1322, 2004.