



**EVALUACIÓN DEL PROCESO AVANZADO DE OXIDACIÓN FENTON COMO  
PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA DE MICROALGAS (*Chlorella sp*) EN LA  
PRODUCCIÓN DE BIOGÁS EN UN REACTOR TIPO UASB.**

**KAREN DANIELA PARADA PALACIOS**

**UNIVERSIDAD COLEGIO DE MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C.  
2019**



**EVALUACIÓN DEL PROCESO AVANZADO DE OXIDACIÓN FENTON COMO  
PRETRATAMIENTO DE LA BIOMASA DE MICROALGAS (*Chlorella sp*) EN LA  
PRODUCCIÓN DE BIOGÁS EN UN REACTOR TIPO UASB.**

**KAREN DANIELA PARADA PALACIOS**

**Trabajo de grado para optar al título de  
Bacterióloga y Laboratorista clínica**

**ASESORA INTERNA**

**JOVANNA ACERO GODOY M.SC.**

**ASESOR EXTERNO**

**JAIME ERNESTO VARGAS RODRIGUEZ**

**UNIVERSIDAD COLEGIO DE MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C.**

**2019**

## DEDICATORIA

“Mucha gente pequeña, en lugares pequeños, haciendo cosas pequeñas, puede  
cambiar el mundo”

Eduardo Galeano

El presente trabajo experimental va dedicado principalmente a Dios, por ser el  
inspirador y darme perseverancia para continuar en este proceso de obtener uno de  
los anhelos más deseados.

A mis padres *Elizabeth* y *Cesar*; a mis abuelos *Lucelida*, *Elias* y *Marta* por su amor,  
trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta  
aquí y convertirme en lo que soy.

A mi hermano *Camilo* por estar siempre presente, acompañándome y por el apoyo  
moral que me ha brindado a lo largo de esta etapa.

A *Nicolas* por siempre brindarme su cariño y amor profundo, dedicado a ti por  
nunca abandonarme en los momentos desesperación.

A todas las personas que me han apoyado en especial a mis amigas *Angelica* y  
*Carolina* que fueron las acompañantes en esta aventura que parecía ser infinita

Le es dedicado, a cada una de las personas que han hecho que el trabajo se realice  
con éxito en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus  
conocimientos.

## AGRADECIMIENTOS

Dios, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda; este trabajo de tesis ha sido una gran bendición en todo sentido y te lo agradezco intensamente, no cesan mis ganas de decir que es gracias a ti que esta meta está cumplida.

El amor recibido, la dedicación y la paciencia con la que cada día se preocupan mis padres por mi avance y desarrollo de esta tesis es simplemente único, reflejada en este resultado. Gracias a ustedes por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar, creer en mí y en mis expectativas; a mi madre por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio en las que su compañía era para mí como agua en el desierto; gracias a mi padre por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida.

Gracias a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por haberme permitido formarme en ella, gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso, ya sea de manera directa o indirecta, permitiendo que mi sueños se hicieran realidad. A la Universidad Antonio Nariño por permitirme hacer parte de su desarrollo investigativo y acceder libremente a sus instalaciones; permitiendo crecimiento del conocimiento para ambas partes.

Quiero especialmente agradecerle a Jaime Vargas por cada detalle y momento dedicado para aclarar cualquier tipo de duda que me surgiera en la realización del proyecto, a Jovanna Godoy agradecerle por la caridad y exactitud con la que enseñó cada clase, discurso y lección.

Gracias al doctor Juan Valderrama por haber elegido ser maestro, permitiéndome ser parte de su proyecto, y su dedicación en la realización de esta tesis.

De ante mano me queda decir gracias maestros.

<b>Tabla de contenido</b>	<b>Pág</b>
Índice de figura.....	8
Índice de tablas.....	10
Anexos.....	11
Glosario.....	12
Resumen.....	13
Abstract.....	14
INTRODUCCION.....	15
OBJETIVOS.....	20
1. ANTECEDENTES.....	21
1.1 Características morfológicas generales en microalgas identificadas en <i>Chlorella</i> <i>zpfingiensis</i> .....	21
1.2 Método de cultivos líquidos para crecimiento de microalgas-.....	21
1.3 Estudios complementarios en algas.....	21
1.4 Generación de biocombustibles a partir de compuestos orgánicos en microalgas por diferentes métodos de cultivo.....	22
1.5 Diferentes aplicaciones de las microalgas en la industria empleando fotobiorreactores para la concentración de biomasa.....	23
1.6 Empleo del método Fenton para la extracción de lípidos.....	24
1.7 Componentes bioquímicos y biomoleculares relevantes en el empleo de microalgas para la industria.....	25
1.8 Métodos alternativos para la producción de biocombustibles.....	26
2 MARCO REFERENCIAL .....	27
2.1 Algas.....	27
2.2 Clasificación de las algas.....	28
2.3 Características del desarrollo y el crecimiento algal.....	30
2.4 Reproducción celular de las microalgas.....	32
2.5 Necesidades bioquímicas en el desarrollo.....	33

2.6	Descripción teórica del proceso de lisis celular por el método de Fenton.....	34
2.7	Generación del biocombustible para su producción masiva a partir de los compuestos orgánicos de microalgas.....	35
2.8	Aplicación de <i>Chlorella sp</i> en la industria.....	36
2.9	Usos energéticos a partir de las microalgas.....	37
2.10	Biorreactores.....	37
2.11	Operación de los biorreactores.....	39
3	DISEÑO METODOLOGICO.....	42
3.1	Universo, población y muestra.....	42
3.2	Hipótesis variables e indicadores.....	42
3.3	Técnicas y procedimientos.....	44
3.3.1	Crecimiento y aislamiento de <i>Chlorella sp</i> .....	44
3.3.2	Fotobioreactor.....	45
3.3.3	Conteo en cámara de Neubauer.....	46
3.3.4	Formula general para el cálculo de conteo celular en cámara de Neubauer.....	47
3.3.5	Determinación en peso en seco.....	47
3.3.6	Aplicación del pre-tratamiento Fenton.....	47
3.3.7	Reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) .....	48
3.3.8	Evaluación en la producción de biogás.....	49
4	RESULTADOS.....	53
4.1	Aislamiento de las células de microalgas ( <i>Chlorella sp</i> ) en medio Algae Agar.....	52
4.2	Traspaso de las células <i>Chlorella sp</i> en cultivo líquido para obtención de biomasa.....	52
4.3	Lectura en cámara de Neubauer de las muestras de los Erlenmeyer con una OD igual a 1.....	53
4.4	Peso en seco de la biomasa algal.....	55
4.5	Evaluación del método Fenton en la producción de biogás en ensayos a escala de laboratorio simulando el proceso en el biorreactor tipo UASB.....	56
5	DISCUSION.....	63
6	CONCLUSIONES.....	65

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

### Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Fases de crecimiento de un cultivo de microalgas.....	16
<b>Figura 2.</b> Representación gráfica del ensayo Bradford para la detección de proteínas.....	18
<b>Figura 3.</b> Microscopia células de <i>Chlorella sp.</i> .....	29
<b>Figura 4.</b> La fotosíntesis oxigénica de las algas.....	30
<b>Figura 5.</b> Resumen filogenia de las algas.....	31
<b>Figura 6.</b> Los principales modos de reproducción de las algas.....	33
<b>Figura 7.</b> Principales procesos de obtención de energía a partir de la biomasa algal.....	37
<b>Figura 8.</b> Diseño básico de biorreactores para múltiples propósitos.....	41
<b>Figura 9.</b> Fases de intervención directa en las fases del proyecto investigativo.....	44
<b>Figura 10.</b> Metodología para el crecimiento y aislamiento de las células de microalgas <i>Chlorella sp.</i> .....	45
<b>Figura 11.</b> Esquema del funcionamiento y operación del fotobiorreactor.....	46
<b>Figura 12.</b> Esquema del proceso y operación del bioreactor UASB.....	49
<b>Figura 13.</b> Montaje de los ensayos para la medición de biogás en botellas de 250ml.....	50
<b>Figura 14.</b> Aislamiento de microalgas ( <i>Chlorella sp.</i> ) en Algae Agar con cloranfenicol.....	52
<b>Figura 15.</b> Proceso de crecimiento e incubación de las microalgas ( <i>Chlorella sp.</i> ) en cultivo liquido.....	52
<b>Figura 16.</b> Crecimiento de <i>Chlorella spp</i> en Erlenmeyer de 500ml y 1000ml en cultivo liquido incubado a 37°C.....	53
<b>Figura 17.</b> Comparación del peso de las capsulas de porcelanas y su valores respectivos para la determinación de peso seco.....	57
<b>Figura 18.</b> Concentración del pellet de microalgas <i>Chlorella sp</i> después de haber sido centrifugadas a 4500 r.p.m. durante 15 minutos.....	57
<b>Figura 19.</b> Concentración de pellet de microalgas <i>Chlorella sp</i> a un volumen final de 100ml.....	57

<b>Figura 20.</b> Comparación de los ensayos de producción y desplazamiento del gas en centímetros cúbicos durante 8 días.....	59
<b>Figura 21.</b> Proyección del ensayo en microalgas tratadas con Fenton mas lodo granular.....	61
<b>Figura 22.</b> Producción de biogás y generación estable de metano obtenido a partir de un bioreactor tipo UASB alimentado con microalgas del genero <i>Scenedesmus oblicuo</i> .....	64
<b>Figura 23.</b> Cuadrantes del conteo celular de microalgas ( <i>Chlorella sp</i> ) en la muestra pura sin diluir.....	74
<b>Figura 24.</b> Cuadrantes del conteo celular de microalgas ( <i>Chlorella sp</i> ) en la muestra con dilución 1/33.....	75
<b>Figura 25.</b> Cuadrantes del conteo celular de microalgas ( <i>Chlorella sp</i> ) en la muestra con dilución 1/5.....	76
<b>Figura 26.</b> Cuadrantes del conteo celular de microalgas ( <i>Chlorella sp</i> ) en la muestra con dilución 1/2.....	77
<b>Figura 27.</b> Cuadrantes del conteo celular de microalgas ( <i>Chlorella sp</i> ) en la muestra con dilución 1/10.....	78

## Listas de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Diferentes métodos de irrupción celular para la liberación de compuestos orgánicos y su posterior producción de biogás.....	17
<b>Tabla 2.</b> Cuadro comparativo, diferencias entre macroalgas y microalgas.....	28
<b>Tabla 3.</b> Taxonomía y características morfológicas del genero <i>Chlorella sp.</i> .....	29
<b>Tabla 4.</b> Comparación entre biorreactores cerrados y abiertos. Tomado de Microalgas para la industria alimenticia.....	39
<b>Tabla 5.</b> Determinación de indicadores dependientes e independientes como objeto de estudio.....	43
<b>Tabla 6.</b> Distribución de las diluciones empleadas para el posterior conteo celular en cámara de Neubauer.....	54
<b>Tabla 7.</b> Resultado del conteo de células de microalgas ( <i>Chlorella spp</i> ) empleando la fórmula general para el conteo celular en cámara de Neubauer.....	54
<b>Tabla 8.</b> Determinación del coeficiente de Pearson en dos variables cualitativos.....	58
<b>Tabla 9.</b> Datos obtenidos de las muestras de microalgas ( <i>Chlorella sp</i> ) después de haber sido incubadas en el horno secador.....	55
<b>Tabla 10.</b> Lectura del método Fenton mediante el ensayo Bradford a una absorbancia de 595nm.....	58
<b>Tabla 11.</b> Desplazamiento del biogás, como factor medible en los diferentes ensayos montados.....	58

<b>Tabla 12.</b> Proyección en la producción de biogás comparando la tendencia lineal respecto a la tendencia polinómica.....	60
<b>Tabla 13.</b> Distribución porcentual de producción de biogás del punto estadísticamente representativo.....	62
<b>Tabla 14.</b> Curva de calibración para lectura de proteínas por el método Bradford.....	72
<b>Tabla 15.</b> Resultados de los ensayos para la cuantificación de proteínas mediante el empleo del método Bradford a una absorbancia de 595nm.....	74

### Lista de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Preparación de medio algas y antibiótico.....	69
<b>Anexo 2.</b> Preparación de albumina sérica bovina (BCA).....	69
<b>Anexo 3.</b> Preparación del reactivo Bradford empleado en la cuantificación de proteínas...69	
<b>Anexo 4.</b> Determinación de peso en seco.....	70
<b>Anexo 5.</b> Estandarización del método Fenton como pre-tratamiento en microalgas ( <i>Chlorella</i> sp).....	70
<b>Anexo 6.</b> Resultado de cada una de las diluciones por cuadrante.....	71

## Glosario

(a.a)	Aminoácidos
(Abs)	Absorbancia
(ATP)	Adenosín trifosfato
(CM)	Cloranfenicol
(n)	Haploide
(NADPH)	Fosfato de dinucleótido de dihidronicotinamida-adenina
(OD)	Densidad óptica
(FBR)	Fotobiorreactor
(PBR)	Fotobiorreactores cerrados
(TG)	Triglicéridos
(UADC)	Ultra alta densidad celular
(UASB)	Reactor anaerobio de flujo ascendente
(2n)	Diploide

## **RESUMEN**

En los últimos años el cultivo de microalgas por su gran contenido de lípidos, proteínas y vitaminas ha venido en aumento, siendo empleadas en la industria de alimentos, industria farmacéutica con aplicaciones en la nutrición y salud humana, en la industria de los cosméticos y en la producción de biocombustibles (alcohol, biodiesel, metano). El agotamiento de los combustibles fósiles (petróleo, carbón), así como los costos elevados en la producción y la contaminación que generan estas fuentes de energía no renovables han fijado su mirada en el empleo de la biomasa algal con fines energéticos, siendo una alternativa viable. Sin embargo, esta biomasa requiere de un pre-tratamiento antes de ser puesta en los biorreactores y estos pre-tratamientos hoy día son costosos y con baja rentabilidad. Es por ello que el siguiente trabajo tiene como objetivo evaluar el método Fenton como pre-tratamiento de la biomasa algal, cuantificando la producción de biogás en un biorreactor anaerobio de flujo ascendente (UASB).

La concentración de biogás fue evaluada en botellas de 250 ml las que contenían 100ml de biomasa algal y 100ml de lodo granular; estos ensayos se realizaron por triplicado, siendo previamente tratados con la reacción Fenton (proceso de oxidación avanzada que produce radicales altamente reactivos de hidroxilo); evidenciando que el método logró

potencializar la ruptura de la membrana celular (*Chlorella sp*) en menos tiempo, haciendo que se generará la liberación de su contenido celular (proteínas, lípidos). Se demostró que la reacción Fenton tuvo un rendimiento de 76,67% de producción de biogás.

**Palabras claves;** Biogás, *Chlorella sp*, Biorreactor, Fenton, Biocombustible

### **Abstract**

In recent years, the cultivation of microalgae due to its high content of lipids, proteins and vitamins has been increasing, being used in the food industry, pharmaceutical industry with applications in nutrition and human health, in the cosmetics industry and in The production of biofuels (alcohol, biodiesel, methane). The depletion of fossil fuels (oil, coal), as well as the costly costs in production and pollution generated by these non-renewable energy sources they have set their sights on the use of algae biomass with energy fines, being a viable alternative. However, this biomass requires a pretreatment before being placed in the bioreactors and these pretreatments today are expensive and with low profitability. That is why the following work aims to evaluate the Fenton method as a pretreatment of algal biomass by quantifying the production of biogas in an anaerobic upstream bioreactor (UASB).

The biogas concentration was evaluated in 250 ml bottles containing 100 ml of algal biomass and 100 ml of granular sludge; These tests were performed in triplicate, being previously treated with the Fenton reaction reaction (advanced oxidation process that produces highly reactive hydroxyl radicals); evidencing that the method managed to

potentiate the rupture of the cell membrane (*Chlorella sp*) in less time, causing the release of its cellular content (proteins, lipids). It was shown that the Fenton reaction had a yield of 76.67% of biogas production.

**Keywords;** Biogas, *Chlorella sp*, Bioreactor, Fenton, Biofuel

## INTRODUCCIÓN

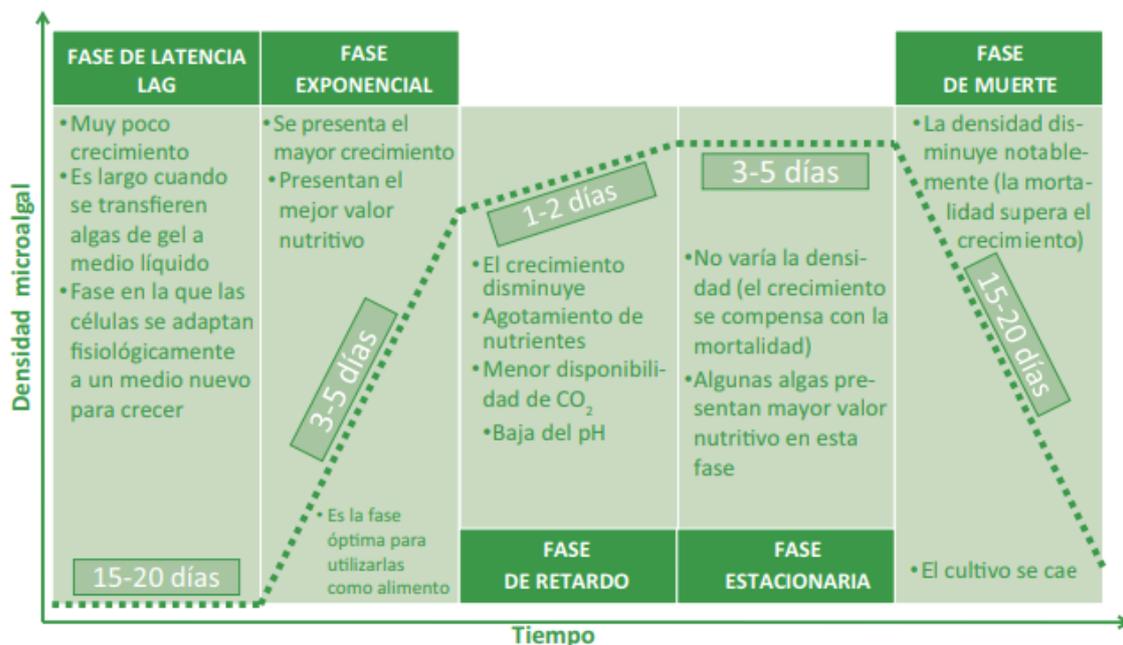
Durante los últimos años, se han realizado extensas investigaciones sobre las microalgas, buscando herramientas alternativas para su utilización en la producción de biocombustibles, siendo económicamente viables, amigables con el medio ambiente y renovables; así como la obtención de subproductos que tengan un valor agregado. Actualmente los procesos industriales para la obtención de combustibles son costosos y dañinos para el medio ambiente, por el contrario los biocombustibles, son fuentes de energía renovable que ofrecen seguridad bioenergética, seguridad alimentaria, emiten menos gases con efecto invernadero, además de tener un efecto positivo en la mitigación del calentamiento global. Es por ello que se han empleado procesos en donde intervenga la energía propiciada por la luz (proceso fotosintético); utilizada para generar un crecimiento apropiado de las algas, generando reacciones metabólicas y obteniendo subproductos como carbohidratos, proteínas, lípidos y pigmentos, que son útiles en el sector agrícola, el sector industrial y la bioenergía. (1) Es por ello que se ha planteado la idea de sustituir los combustibles fósiles como el petróleo; (recurso no renovable y en estado de agotamiento) debido a que el uso de esta fuente ha conllevado al aumento en la emisión de gases con efecto invernadero, los cuales a la vez generan calentamiento global y grandes volúmenes de contaminación de fuentes hídricas. (2) El esfuerzo de las investigaciones enfocadas a la creación de las

energías alternas pretende dar solución a problemas específicos relacionados al uso desmesurado y descontrolado de los combustibles fósiles. (3)

El presente trabajo de grado se planteó ¿Qué tan eficiente es la reacción Fenton como pretratamiento en la biomasa producida por microalgas (*Chlorella sp*), para el rompimiento de la pared celular y la liberación de los compuestos orgánicos en la producción de biogás?

### **Cultivo potencial de microalgas**

El cultivo de microalgas se ha logrado posicionar como una alternativa eficaz para producir biocombustible a gran escala, bajar las concentraciones de dióxido de carbono y limpiar aguas contaminadas; aprovechando que estos microorganismos fotosintéticos requieren elementos básicos para su alimentación y crecimiento, son capaces de utilizar el dióxido de carbono ( $CO_2$ ), agua y energía solar para producir biomasa; (4) siendo interesantes en este contexto ya que por su elevado contenido de lípidos (importantes en la producción de biodiesel), su fácil acceso dado a que son cosmopolitas (habitan en agua de mar, agua dulce, aguas residuales o en el suelo), crecen en un amplio intervalo de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; su estructura unicelular o multicelular simple, permiten ser empleadas y moldeadas en las distintas áreas industriales. (5) Para lograr una estimación respecto al potencial desarrollo de las microalgas es importante conocer las fases del crecimiento de las mismas, según González (6) la curva de crecimiento celular está compuesta por cinco fases, las que se definen por el número de células presentes en un tiempo determinado y por las condiciones generales del cultivo: la primera etapa es la Fase de ajuste donde las microalgas se adaptan a las nuevas condiciones de cultivo; la segunda es la Fase exponencial, la división celular se incrementa en función del tiempo, debido a la asimilación de nutrientes desde el medio con respecto a su activo proceso de reproducción, la tercera es la Fase de retardo o declinación donde la tasa de crecimiento se reduce, por lo que el tiempo para duplicar la población aumenta; posterior a ello la cuarta Fase es estacionaria en donde el factor limitante y la tasa de crecimiento están equilibrados, las densidades celulares se mantienen relativamente constantes; y por último encontramos la Fase de muerte que evalúa la tasa de mortalidad, la cual es superior a la tasa de multiplicación celular (7) (Figura 1)



**Figura 1.** Fases de crecimiento de un cultivo de microalgas. Tomado de Ospina Gloria et al. Avances en la reproducción y mantenimiento de peces marinos ornamentales. (8)

Con base a los parámetros de crecimiento celular se evalúan los principales componentes orgánicos de la biomasa microalgal como lo son las proteínas, lípidos y carbohidratos, los cuales suelen variar dentro de una misma especie, dependiendo a las condiciones de nutrición y temperatura a las que se someta el cultivo. (3) Para garantizar la ruptura eficaz y rápida de las células de microalgas se han estandarizado diferentes métodos. (Ver tabla 1)

MÉTODO	CARACTERISTICAS DEL MÉTODO
Físicos	La sonicación que es un método en el cual se emplea la energía del sonido (ultrasonido) permitiendo la agitación de partículas de una muestra, la corriente eléctrica transmite su energía a un sistema mecánico convirtiéndola en vibraciones de alta intensidad que generan ondas de ultrasonido.
Biológicos	Estos métodos emplean microorganismos bacterianos anaerobios y aerobios, archeas e inclusive hongos que descomponen las macromoléculas generando un producto final como biogás.
Químicos	Se suelen emplear enzimas o radicales libres que intervienen en la lisis celular, permitiendo la liberación de los componentes orgánicos.

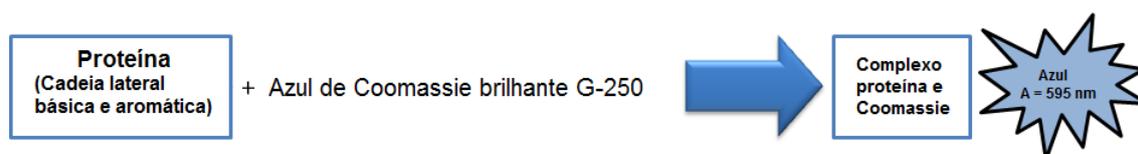
---

Dentro de este último podemos destacar el Fenton que consiste en un proceso de oxidación avanzada en el cual se producen radicales altamente reactivo del hidroxilo, bajo condiciones como lo es un ambiente ácido, con presión y temperatura ambiente; permitiéndole ser un método de bajo costo.

---

**Tabla 1.** Diferentes métodos de irrupción celular para la liberación de compuestos orgánicos y su posterior producción de biogás. Tomado de E. Günerken et al. Cell disruption for microalgae biorefineries (9)

La identificación de las proteínas totales se puede estimar por la medición de la densidad óptica (OD) mediante espectrofotometría, basado en el método Bradford. El ensayo Bradford, originalmente descrito por Marion Bradford (1976); se basa en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie G-250 y las proteínas en solución; la forma azul más aniónica (negativa) se une a proteínas y esta se absorbe a 595nm. La concentración de proteínas puede ser evaluada determinando la cantidad de colorante en su forma iónica azul y midiendo la absorbancia de la solución a 595nm utilizando un espectrofotómetro, y comparándola con una tabla de calibración realizada con albumina (10) (Figura 2)



**Figura 2.** Representación gráfica del ensayo Bradford para la detección de proteínas. Tomado y descrito por Johnson (11)

### Alternativa en la producción de los combustibles

Los biocombustibles son una excelente opción, dado a que pueden llegar a ser menos costosos en la producción de igual forma ayuda a la preservación del medio ambiente pues genera un menor impacto ambiental; de ahí que el incentivar la producción de la biomasa algal como alternativa para generar biogás conduce al desarrollo investigativo. Pese a ello su implementación en la producción no es altamente eficiente, lo que ha imposibilitado posicionarse como un sustituto del petróleo. Uno de sus impedimentos es principalmente

escindir o descomponer la pared celular, debido a que esta membrana es altamente recalcitrante; es por ello que se han planteado diferentes métodos para generar la lisis de la pared celular, entre ellos se encuentran métodos químicos, físicos y biológicos que intervienen y son partícipes de esta ruptura. (Ver tabla 1) Con base en lo mencionado anteriormente dentro de la investigación se ha planteado destacar un método químico como lo es la reacción Fenton puesto que permite la liberación de radicales hidroxilo que atacan la pared celular, permitiendo la liberación del contenido celular (proteínas y lípidos) que son la materia prima para la posterior producción de biogás, estableciéndolo de ese modo un método hipotéticamente considerable.

Es por ello que este trabajo de grado busca evaluar, el método Fenton como pre-tratamiento de la biomasa producida con microalgas del género *Chlorella sp*, con el fin de producir biogás en un reactor tipo UASB, impactando en la mitigación del dióxido de carbono ( $CO_2$ ), la contaminación ambiental con medidas sostenibles y sustentables que fortalezcan la industria de producción de los biocombustibles. Cabe resaltar que la realización de este proyecto es una fracción del mega-proyecto titulado “Evaluación de dos pre-tratamientos sobre la biomasa de microalgas (*Chlorella sp*) para mejorar la producción de metano al procesarla en un biorreactor tipo UASB” a cargo del Msc. Jaime Ernesto Vargas Rodríguez, maestro de la universidad Antonio Nariño y asesor del presente proyecto.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el proceso de oxidación avanzada de Fenton en el pre-tratamiento de la biomasa producida por el cultivo de microalgas (*Chlorella sp*) para la posterior producción de biogás en un biorreactor tipo UASB.

### **Objetivos específicos**

- Estandarizar y optimizar la producción de biomasa algal en fotobiorreactores a escala de laboratorio
- Optimizar el proceso de Fenton como pretratamiento de la biomasa, garantizando la ruptura de la pared celular de las células *Chlorella sp.* con el fin de liberar los componentes orgánicos que serán empleados en la obtención del biogás.

- Analizar la producción de biogás en el biorreactor tipo UASB una vez se ha utilizado el método Fenton como pretratamiento

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Características morfológicas generales en microalgas identificadas en *Chlorella zofingiensis*

Bar et al en el año de 1995 (12) determinaron la respuesta frente a exposiciones de condiciones combinadas a partir del descubrimiento de una microalga unicelular (verde) *Chlorella zofingiensis* perteneciente al filo Chlorophyta, aproximadamente de un tamaño entre 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, con pigmentos verdes fotosintetizadores lo que le permite mantener una energía de eficiencia fotosintética esenciales en sus procesos metabólicos y reproductivos; requiriendo esencialmente para su crecimiento dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), agua, luz solar y pequeñas cantidades de minerales; se destaca la propiedad de su capa lipídica la cual funciona como un filtro de luz que reduce la irradiación de los componentes celulares, previniendo el daño foto-oxidativo y de ese modo reducir las pérdidas de agua (12)

### 1.2. Métodos de cultivos líquidos para crecimiento de microalgas

El equipo de Malik KA. A (1995) (13), describieron un procedimiento simple para mantener las algas verdes unicelulares en cultivos líquidos de crecimiento lento durante tiempos relativamente largos. Con este método, los cultivos de *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus*, se mantuvieron viables y estables durante más de 12 meses en condiciones de luz tenue a temperaturas relativamente bajas sin agitación. Durante el almacenamiento no se requirió de un subcultivo regular o transferencia a medio fresco. (13) Para el almacenamiento de cultivos líquidos, se utilizaron matraces erlenmeyer de boca ancha o matraces de cultivo de tejidos (con membranas para la aireación sin contaminación). Para aumentar la supervivencia y la estabilidad de las células, se agregaron a las suspensiones celulares diversos materiales de adsorción o estabilizadores, como el carbón activado y la trehalosa. El método resultó útil para el trabajo de rutina, ya que proporcionaba una fuente continua de inóculo. (13)

### **1.3. Estudios complementarios en algas**

Para el año de 1995 Córdoba y colaboradores describieron la inmovilización de dos cepas diferentes de algas eucarióticas (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda*) y la influencia de los medios de soporte. Los medios de poliuretano mostraban un mejor comportamiento como soporte para la inmovilización de microalgas que el alginato de sodio para el tratamiento del estiércol de ganado. Además, los resultados abren la posibilidad de utilizar microalgas inmovilizadas para la eliminación de nitrógeno amoniacal y ortofosfato de amoníaco en el tratamiento de aguas residuales cloacales. (2) (14) Los mismos expertos para ese mismo año realizaron algunos estudios complementarios sobre el tratamiento de los compuestos finales provenientes del estiércol de ganado como lo son (nitrógeno y fosfatos de amoníaco), estableciendo una correlación entre las algas inmovilizadas sobre el tratamiento del estiércol de ganado describiendo su posible potencial al ser una solución para prevenir la eutrofización del agua, debidamente tratada con *Phormidium sp* inmovilizado con quitosano; en donde se observó una eliminación del 98% de nitrógeno y un 60% de compuestos de fosforo en 24 horas. Cabe resaltar que estos resultados fueron más eficientes bajo condiciones de luz natural (2) (15)

### **1.4. Generación de biocombustibles a partir de compuestos orgánicos en microalgas por diferentes métodos de cultivo**

En los posteriores estudios se llevaron a cabo actividades de fosfatasa, esterasa y diversas glicosidasas que garantizaban la producción de un subproducto, estas se midieron con paredes celulares aisladas y con células completas de *Chlorella* y *Scenedesmus* utilizando sustratos p-nitrofenilados, sin embargo, se discute el papel de estas enzimas unidas a la pared celular, su aparición en algas verdes y su intervención en la producción de biodiesel. (16)

Para el año 2006 Xu et al (17) publican un artículo en donde se definía la producción de biodiesel de alta calidad a partir de una microalga *Chlorella protothecoids* siendo evaluada a través de la tecnología de transesterificación la cual involucra una secuenciación para controlar el proceso metabólico de la especie *Chlorella protothecoids* y de ese modo involucrar el crecimiento heterótrofo de *C. protothecoides*; esto resaltaba debido a su potencial de generar biocombustible de alta calidad, principalmente por su contenido de lípidos. Cabe resaltar que se empleó hidrolizado de maíz en polvo, en lugar de glucosa como fuente de energía, mostrando una densidad celular aumentada. Debido a esta modificación se obtuvo resultados sorprendentes, al notarse que la biomasa aumentó y del mismo modo se logró reducir el costo de producción del alga. (18)

Cuatro años más tarde se identificó que el cultivo de microalgas verdes en estiércol lácteo digerido servía como un complemento nutritivo para el cultivo; debido a que traía grandes beneficios como un índice de crecimiento mayor; esto se demostraba al comparar diferentes diluciones respecto a la velocidad de crecimiento, ofreciendo una eficiencia de eliminación de nutrientes y composición final de ácidos grasos de las microalgas, e igualmente se estableció que la interacción de los compuestos orgánicos y la velocidad en el crecimiento pudieron estar relacionadas a la microflora del estiércol. (18) Al aumentar la productividad de lípidos se redujo el costo de producción de biodiésel de microalgas. También se pudo determinar que las condiciones de cultivo se veían afectadas por diferentes iones; igualmente la concentración de irradiancia en el crecimiento celular pudieron ser determinados mediante el contenido de clorofila a y la acumulación de lípidos de *Chlorella sp* evaluados en un fotobiorreactor (FBR) de burbujeo por membrana. (19)

### **1.5. Diferentes aplicaciones de las microalgas en la industria empleando fotobiorreactores para la concentración de biomasa**

El empleo de las microalgas ha involucrado otras áreas como es el caso de establecerse como una fuente alimentaria y su disposición a ser empleada en métodos de producción en masa para su cultivo en grandes depósitos artificiales dado a que su peso en seco es cerca del 45% de proteína, 20% de grasa, 20% carbohidratos, 5.0% de fibra, 10% de minerales y vitaminas. (20)(21) De igual modo, se ha constituido como una de las opciones más factibles y potenciales para la producción industrial de biocombustible a partir de diferentes especies de *Chlorella sp*, pese a ello encontrar las cepas para el sistema de cultivo concentrado y evaluar el efecto de los factores ambientales que incluyen la intensidad de luz, ciclo de luz-oscuridad, y el oxígeno, que determinan la concentración en la acumulación de biomasa; la eliminación de nutrientes de aguas residuales y la producción de biodiesel, suelen variar en las diferentes técnicas, o desarrollos investigativos. (22) Es por ello que la acumulación en la concentración de biomasa se ha potencializado y se ha estandarizado diferentes tipos de FBR como lo son los fotobiorreactores cerrados (PBR) usados generalmente para la producción de biomasa de microalgas de alto valor. (23) En la investigación se demostró que las microalgas mixotróficas muestran una mayor tasa de crecimiento específico debido a la concentración final de biomasa y productividad de lípidos, almidón y proteínas que las microalgas cultivadas bajo condiciones fotoautótrofas. (22)

Ahora bien, para redirigir la biomasa, la configuración del fotobiorreactor es un factor clave para el crecimiento o la composición de la microalga, se espera que la calidad lipídica de la biomasa desarrollada en los FBR cumpla los estándares para biodiesel, especialmente en el caso de la configuración helicoidal dado a que este permite condiciones homogéneas, favorece la transferencia de nutrientes, la dispersión uniforme de las microalgas entre las zonas oscuras e iluminadas, transferencia de energía, la configuración helicoidal igualmente evita la estratificación térmica ya que puede existir amplitud térmica entre fondo y superficie del fotobiorreactor de hasta 8° C. (24) Un buen mezclado en los fotobiorreactores puede aumentar la productividad hasta 40% en un fotobiorreactor tubular y potencializar la producción de biocombustibles utilizando biomasa algal mediante el acoplamiento del tratamiento avanzado de aguas residuales con el cultivo de microalgas; valorando principalmente la producción de lípidos. (25) Pese a ello la disrupción directa de la pared celular en las microalgas aún sigue siendo un tema debatible puesto que en las investigaciones realizadas han descrito un sinnúmero de métodos físico, químicos y biológicos

pero hasta el momento ninguno ha logrado generar rentabilidad suficiente. (26) es por ello que para el año 2013 una investigación empleó “microorganismos líticos” capaces de romper la pared celular de especies de algas, debido a su ruptura superficial este lograría ser un método factible, ya que contribuiría a la liberación total de proteínas y lípidos para la producción de biocombustibles, contrario a lo que suele estimarse con los métodos químicos caso específico de enzimas que pueden degradar ciertos componentes adheridos a la pared celular (lípidos y proteínas solubles). (27)

### **1.6. Empleo del método Fenton para la extracción de lípidos**

En el año 2015 se empleó el proceso de oxidación Fenton para la extracción de lípidos en un tipo de microalga. Para esta investigación se empleó la pirita oxidada en la etapa de esterificación como un tipo de catalizador; lo que reducía completamente los costos en la producción de biodiesel. Como resultado se determinó que los ácidos grasos libres Feton convertidos en esteres metílicos de ácidos grasos bajo condiciones acidas. (27)(29)

### **1.7. Componentes bioquímicos y biomoleculares relevantes en el empleo de microalgas para la industria**

Recientemente se ha demostrado que las algas tienen una alta productividad, se pueden cultivar en espacios pequeños, sin que compitan con terrenos agrícolas. Su biomasa se puede utilizar para la producción de biocombustible ayudando en las demandas energéticas, debido a la composición de componentes principales de su biomasa como lo son: las proteínas, cuyo porcentaje sobre el peso seco puede variar del 46-63%; los carbohidratos, con porcentajes generalmente entre el 10-20% y los lípidos, con porcentajes que varían del 20-61%. (20) (21) Su estimación porcentual ha incentivado a la investigación con nuevas especies de microalgas verdes unicelulares, como la realizada en el humedal del Parque Forestal Olímpico de Beijing, China (28) según el proyecto se encontraron varias especies del género *Chlorella sp* con capacidad de adecuarse a situaciones extremas, y con bajos requerimientos nutricionales. (29) Pese a ello ha sido evaluado que el empleo de algas bajo la suplementación de carbono orgánico contribuye significativamente a un mayor costo de producción de microalgas pudiendo competir con la alimentación humana y animal. Sin embargo, la investigación realizada de China valora el uso de fuentes de carbono de segunda generación a partir de residuos de la agricultura, el empleo de algas con bajos requerimientos nutricionales, y el uso de especies provenientes de aguas residuales que

puedan ser aplicadas a la industria, ofreciendo ser una solución interesante en la producción de biocombustibles. (30)

Los modelos mecánicos para el crecimiento de microalgas en aguas residuales desarrollado para el diseño de nuevos sistemas, han mejorado la comprensión de los procesos para la producción de biomasa. (29) Siendo el caso de la simulación del efecto de los promotores de turbulencia de pared, es decir, perfiles en la pared del tubo interno, que a bajas velocidades de flujo suelen tener comportamientos similares al mezclado en reactores tubulares estándar que mantienen una velocidad de flujo aplicada. (31)

La viabilidad del biodiesel en microalgas está basada a partir de ácidos grasos y la síntesis de triacilglicerol, la cual puede estar monitoreada mediante la genómica comparativa y extracción transcriptómica, realizada en la investigación por Tamanna Sharma y colaboradores año , en la cepa *Scenedesmus obliquus* SA1 en simultaneo se investigó su capacidad en cuanto al crecimiento. (32) El aislamiento de nuevas cepas de microalgas con propiedades únicas y valiosas de diversas condiciones ambientales es un punto de partida importante para el establecimiento de materia prima de alta calidad para la producción de biocombustibles. (33) Del mismo modo la optimización de los parámetros operacionales para maximizar la eficiencia de utilización de  $C_2$  por microalga *Scenedesmus obliquus* SA1, cultivada en un fotobiorreactor a diferentes concentraciones operativas demostrando su intervención en la producción de biomasa estableciendo la continuidad de genes propios de ácidos grasos. (34)

### **1.8.Métodos alternativos para la producción de biocombustibles**

El biofloculante de *Cobetia* según las investigaciones podría ser utilizado para la recolección efectiva de la microalga *Chlorella vulgaris* mediante el empleo de la floculación, este biofloculante tiene potencial para la cosecha de alta eficiencia de microalgas y puede ser útil para reducir algunas de las barreras de las microalgas para la producción de biocombustibles. (35) Se presenta un modelo que combina la descripción matemática para la producción de azúcar fotoautótrofo con una descripción del crecimiento aerobio de la biomasa quimio-heterotrófica en un modelo experimental aplicado a la microalga *Chlorella reinhardtii* por tal motivo el proyecto fue evaluado de modo cuantificable, estimando su potencial en la producción, como medida investigativa a nuevas

opciones. (35) Por otro lado, la cavitación hidrodinámica (HC) aplica como un pretratamiento de optimización para la disrupción celular. Las condiciones óptimas para la interrupción celular fueron la carga sólida (1% p / v), el ciclo de trabajo (80%), la potencia de entrada (54 W) y el tiempo (90 min). Después del pretratamiento con hidróxido de sodio al 0,5% p / v. El tiempo de hidróxido de sodio requerido para la disrupción celular usando HC se redujo a 105 min. Además, se calculó la energía requerida para la disrupción celular descubrió que el HC era significativamente más eficiente y escalable para la disrupción celular de microalgas. (36)

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Algas

Al hablar de algas se refiere a un conjunto grande y variado de los organismos eucariotas que contienen clorofila y realizan la fotosíntesis utilizando oxígeno y liberando el agua como donador de electrones en términos de sustratos y productos químicos. El pigmento fotosintético está definido por dos tipos de propiedades bioquímicas, el primero es el tipo de pigmento y el segundo corresponde a la reserva alimenticia. (6) Además, algunas algas pueden utilizar el  $H_2$  para la fotosíntesis sin la liberación de oxígeno. Muchas algas son fotótrofas y por lo tanto requieren de luz para su crecimiento. (36) El término alga se aplicaba a todos los vegetales unicelulares (constituidos por una sola célula), cenobiales (constituidos por varias células sin división entre sí) y talófitos (no estructurados en raíz, tallo y hojas) que viven en aguas dulces o marinas, y que estaban provistos de pigmentos de

asimilación (euglenofíceas, crisofíceas, pirrofíceas, xantofíceas, entre otros). (36) Sin embargo ha habido múltiples pérdidas de la capacidad para la fotosíntesis en diferentes especies, dichas pérdidas también se han producido en los embriones, lo que aumenta la complejidad de tratar de definir estos linajes en términos funcionales. (29)

Morfológicamente las algas pueden ser comprendidas como plantas celulares que crecen de formas individuales o agregaciones, por lo general estas son indiferenciables en órganos y solamente en los géneros más complejos se encuentran tejidos conductores. (6) Normalmente se encuentran habitando ambientes húmedos (tierra, aire, mar, lagunas, hielo y nieve) ocupando capas superficiales hasta los niveles donde hay penetración de luz solar. (37)

La típica célula algal posee paredes rígidas o presentar láminas que cubren a parte exterior de las paredes, los orgánulos que contienen pigmentos de las clorofíceas y euglenofíceas llamados cloroplastos; otros orgánulos pigmentados de las algas se les designa como cromatóforos, siendo estas células importantes en los sistemas enzimáticos debido a la fotosíntesis (6)

## **2.2. Clasificación de las algas**

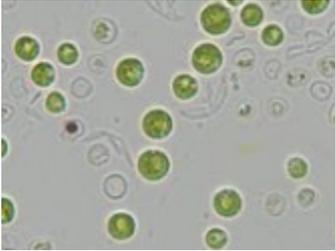
Las algas se clasifican en dos grupos (macroalgas y microalgas) o según su pigmentación en tres grupos (verde, rojo y marrón), donde se observa la presencia de diferentes tipos de polímeros de carbono como producto de reserva, la estructura de la pared celular y el tipo de movilidad. De igual forma, se evidencia que las algas ocupan el primer eslabón en la cadena alimenticia en el ambiente acuático. Son productores primarios capaces de elaborar sustancias orgánicas a partir de sustancias inorgánicas, transformando la energía luminosa que proviene del sol en energía química. (35) (Tabla 2)

Los ficólogos definen a las algas como organismos fotosintéticos con Clorofila a y con estructura de talo no diferenciada en raíces, tallo u hojas como las plantas vasculares. Se estima más de 50.000 especies de microalgas, de las cuales, sólo un número limitado de alrededor de 30.000 se han estudiado y analizado. (38)

MACROALGAS	MICROALGAS
Estas algas por lo general son macroscópicas; se fijan a una superficie firme y crecen en abundancia como algas marinas en zonas intermareales y submareales, a una profundidad cercana a 268m, según la penetración de la luz solar.	Las microalgas son microorganismos por lo general microscópicos fotosintéticos procariotas o eucariotas que pueden crecer rápidamente debido a su estructura multicelular, unicelulares o simples
Crecen sobre rocas que se encuentran en agua dulce estancada o corriente y, por lo general, se desprenden y flotan formando el verde de las aguas.	Las microalgas están presentes en todos los ecosistemas de la tierra, no sólo acuáticos y terrestres, lo que representa una gran variedad de especies que viven en diferentes condiciones ambientales.

**Tabla 2.** Cuadro comparativo, diferencias entre macroalgas y microalgas tomado de Atlas de Microorganismos, Planctónicos Presentes en los Humedales Andaluces. Atlas de microorganismos. (39)

Las algas son protistas fotótrofos, incluyendo a los procariontes fotosintetizadores, como las cianobacterias, encontrándose en todos los ecosistemas de la tierra, representan una gran variedad de especies viviendo en un amplio rango de condiciones ambientales. En el mundo se conocen 30.000 especies, de las cuales, alrededor de 50 son explotadas con fines comerciales. (28) Las microalgas tienen el potencial de generar cantidades significativas de biomasa dado que son más eficientes en términos de productividad por unidad de área cultivada, comparadas con otras fuentes vegetales, además de mitigar las emisiones de  $CO_2$  mediante el consumo del mismo en su metabolismo fotosintético. Las altas concentraciones de proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas y pigmentos presentes en las microalgas las hace fundamentales para la alimentación del zooplancton, larvas y estadios juveniles de moluscos, crustáceos y ciertos peces herbívoros. (31) Es por ello que el 30% de la producción de biomasa algal mundial tiene como destino final los alimentos balanceados para dichos animales.(32)

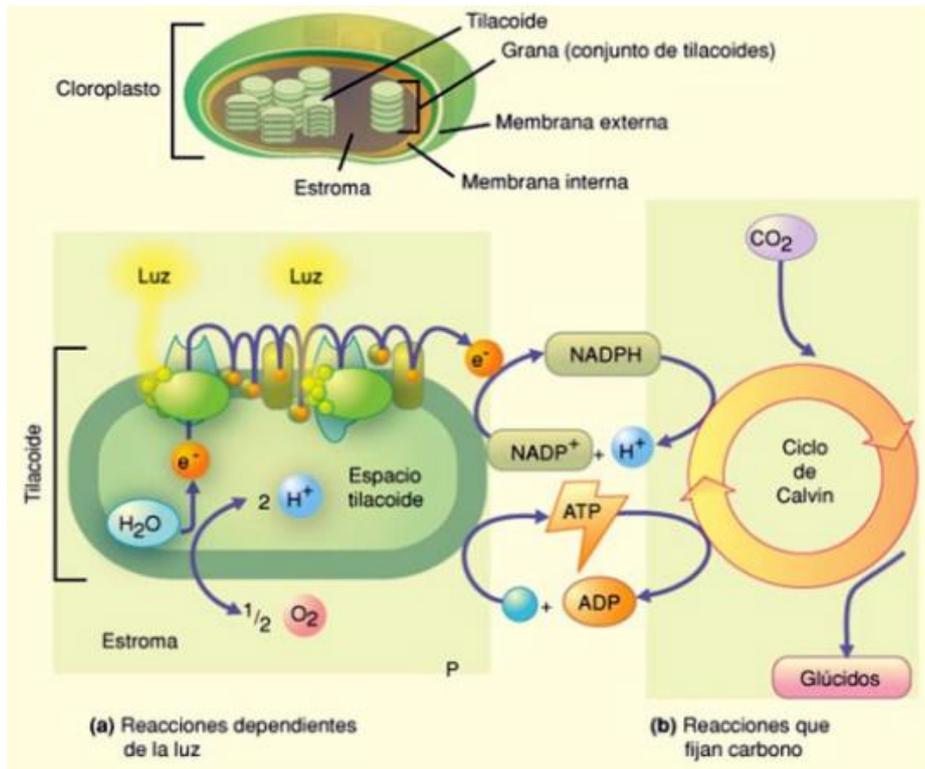
<p style="text-align: center;"><b>TAXONOMIA</b></p> <p>Reino: Plantae (Primoplantae)  División: Chlorophyta  Clase: Trebouxiophyceae  Orden: Chlorellales  Familia: Chlorellaceae  Género: <i>Chlorella sp.</i></p> 	<p>Es un alga unicelular de color verde, de forma esférica, con un diámetro que oscila de 2 a 10 µm.</p> <p>El color verde lo obtiene de cloroplastos que son estructuras encargadas de realizar la fotosíntesis y permiten que su coloración sea verde. Los carotenoides suelen emplearse en contextos de procesos industriales. Se reproduce de forma asexual rápidamente.</p> <p>Habita frecuentemente en ríos, arroyos de agua dulce y suelos encharcados. Contiene cantidades de proteínas, vitamina C, betacaroteno y vitamina B (B1, B2, B6 Y B12) por lo que su estudio se intensifica dada a la posibilidad de ser empleada para producir biodiesel, suplementos alimenticios, productos cosméticos contra el envejecimiento, estimulación del sistema inmune y para la desintoxicación de metales pesados.</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Figura 3.** Microscopia células de *Chlorella sp.*; objetivo 40X. Realizado por Parada Karen 2019

**Tabla 3.** Taxonomía y características morfológicas del genero *Chlorella sp.* Tomado de Atlas de Microorganismos, Planctónicos Presentes en los Humedales Andaluces. Atlas de microorganismos. (39)

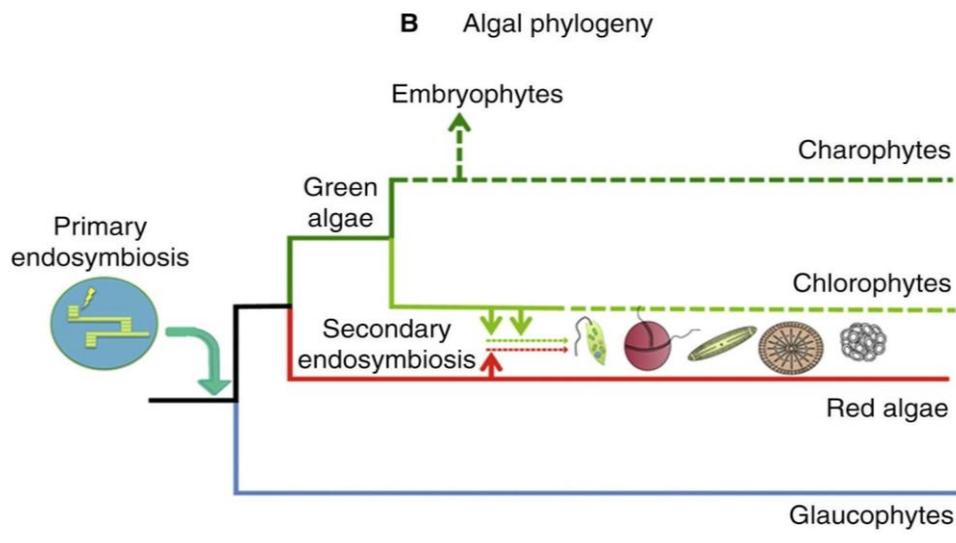
### 2.3. Características del desarrollo y el crecimiento algal.

Las algas son organismos fotoautótrofos, es decir microorganismos que tienen la capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis y que por ende necesitan de la luz para poder desarrollar su ciclo metabólico y celular. Los orgánulos citoplasmáticos encargados de la realización de la fotosíntesis son los cloroplastos, unas estructuras polimorfas y de color verde (esta coloración es debida a la presencia del pigmento clorofila) propias de las células vegetales y algas. (40) En el interior de estos orgánulos se halla una cámara que contiene un medio interno llamado estroma, que alberga diversos componentes, entre los que cabe destacar enzimas encargadas de la transformación del dióxido de carbono en materia orgánica y unos sáculos aplastados denominados tilacoides o lamelas, cuya membrana contiene pigmentos fotosintéticos. (37) (Figura 4)



**Figura 4.** La fotosíntesis oxigénica de las algas. Las algas al igual que las plantas, generan  $O_2$  como un subproducto de la oxidación del agua para la provisión de electrones a la cadena de transporte de electrones fotosintéticos, incluidas las dos reacciones fotoquímicas secuenciales. (38) Esta fase ocurre en la matriz o estroma de los cloroplastos; la energía en forma de ATP como el NADPH que se obtuvo en la fase fotoquímica se usa para sintetizar materia orgánica por medio de sustancias inorgánicas. (40) Su principal fuente de carbono es el  $CO_2$  y su fuente de nitrógeno emplean los nitratos y nitritos, y como fuente de azufre, los sulfatos. Tomado Curtis Biología. (40)

En la actualidad, se diferencian dos tipos de procesos fotosintéticos, que son la fotosíntesis anoxigénica y la fotosíntesis oxigénica. La primera la realizan las bacterias purpúreas y verdes del azufre. Mientras que la segunda es propia de las plantas superiores, las algas y las cianobacterias, donde el dador de electrones es el agua y, como consecuencia, se libera oxígeno como subproducto. (41) Es por ello que esta fotosíntesis oxigénica es considerada monofilética, es decir, todos los organismos incluidos en él; han evolucionado a partir de una población ancestral común; y todos los descendientes de ese ancestro están incluidos en el grupo. Las algas eucariotas son polifiléticas que se refiere a que contiene taxones con múltiples orígenes; dicho de otro modo, está constituido por la unión artificial de ramas dispersas del árbol evolutivo. Esto se puede explicar debido a la aparición de endosimbiosis seriales. (41) (Figura 5)



**Figura 5.** Resumen filogenia de las algas: Las cianobacterias fueron los primeros organismos oxigenados que participaron en un evento endosimbiótico primario que dio lugar a algas eucariotas. Otras endosimbiosis secundarias y terciarias generaron otros grupos de algas. Un clado de las algas verdes, como lo es el grupo carófito es el progenitor de las plantas (embriones). Tomado de Raven y Giordano; *Algae*. (41)

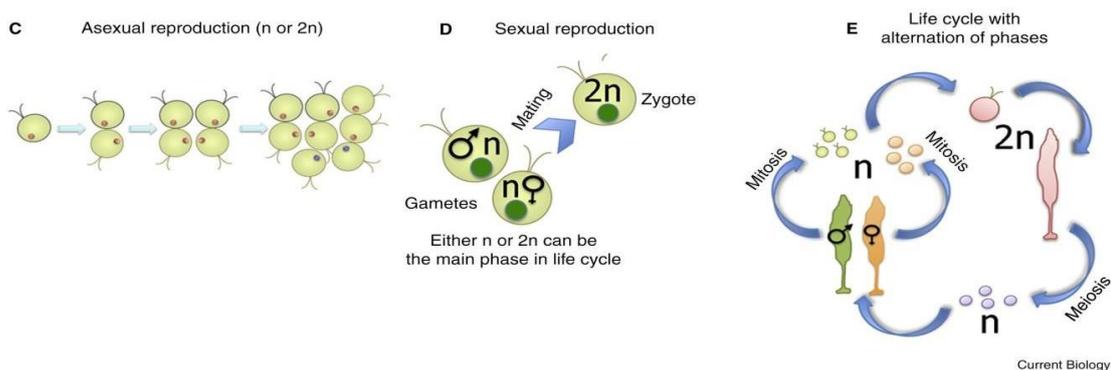
La endosimbiosis primaria que originó las algas eucariotas implicó la incorporación de una cianobacteria por parte de un eucariota para producir los cloroplastos del grupo glaucocistofitos comprendiendo al grupo de algas rojas y verdes, generando la sucesión de plantas embriófitas. (3) La endosimbiosis secundaria de algas rojas y verdes en otros eucariotas produjo otras algas eucariotas; destacando a las algas verdes debido a que dieron lugar a clorarcinofitos y euglenoides y a algas rojas que dieron lugar a apicomplexanos, además de dinoflagelados, criptofitos, haptofitos y heterocontes tales como pardas y diatomeas. (3) Las endosimbiosis terciarias se presentan los dinoflagelados, la primera aparición de cianobacterias, algas eucariotas, así como plantas embriófitas y metazoos con una característica común siendo el aumento de oxígeno a través del tiempo. (41)

La fijación de  $CO_2$  se produce gracias a la catálisis de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa (Rubisco) y otras enzimas del ciclo de Benson-Calvin, con el consumo de ATP y NADPH generado; utilizando la luz como fuente de energía. (40)

## 2.4.Reproducción celular de las microalgas

La reproducción asexual en algas unicelulares implica división celular seguida de separación celular; los mecanismos asexuales incluyen fisión, esporulación y liberación de fragmentos nucleados en formas unicelulares. (42) La fisión es comúnmente binaria y sucede en el interior de la pared celular parenteral; en otros tipos la pared es descartada y cada uno de los progenitores construye una pared antes o después de liberarse de la pared de la célula madre (caso especial en diatomeas y algunos dinoflagelados).

La formación de las colonias de algas implica que las células permanezcan asociadas después de la división celular, pero sin diferenciación, distinguiéndose de los organismos de algas multicelulares con diferenciación entre células vegetativas que incluyen, en algunas cianobacterias, los heterocistos involucrados en la asimilación de dinitrógeno. (43) La reproducción de algas coloniales y multicelulares implica etapas unicelulares asexuales y/o sexuales y para algunos organismos la fragmentación. Con base a lo enunciado algunas microalgas eucariotas (diatomeas y algunas algas verdes) tienen reproducción sexual y las secuencias genómicas completas de algunas algas eucariotas en las que no se ha observado el sexo muestran que estos organismos tienen el aparato genético necesario para la meiosis, un proceso esencial para la reproducción sexual eucariótica. (43) (Figura 6)



**Figura 6.** Los principales modos de reproducción de las algas. Las algas son capaces de reproducirse tanto asexual como sexual, con ciclos de vida que pueden incluir un número variable de etapas haploides y diploides. (44) Las cianobacterias aparecen en el estado haploide (n), mientras que las algas eucariotas aparecen en el estado haploide (n) o diploide (2n). Las cianobacterias no tienen reproducción sexual, mientras que algunas algas eucariotas unicelulares y más multicelulares tienen un componente sexual en el ciclo vital, a veces con dos o incluso tres fases. (3) Tomado de Raven y Giordano; *Algae*. (41)

## **2.5.Necesidades bioquímicas en el desarrollo.**

Las algas necesitan de fuentes ricas en nitrógeno ya que forman parte de un gran número de compuestos orgánicos como lo son los aminoácidos, las proteínas, las coenzimas, los ácidos nucleicos y la clorofila. El fósforo incide en la formación de compuestos orgánicos como lo es la glucosa, el ATP, los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y ciertas coenzimas; por otro lado el azufre está incorporado en diversos compuestos orgánicos que incluyen y proteínas, aminoácidos, la coenzima A y las vitaminas Tiamina y Biotina. (6)

En cuanto a la actividad celular encontramos al magnesio ya que es la parte esencial de la molécula de clorofila y es necesario para la actividad de muchas coenzimas incluyendo el ATP que es primordial para mantener la estructura del ribosoma. El calcio influye en la permeabilidad de la membrana; se encuentra en las vacuolas, de forma precipitada como cristales de oxalato cálcico o pectato cálcico en las paredes de las células. El hierro al igual que el cloro son necesarios en la síntesis de clorofila y es parte esencial del citocromo el cual actúa como portador de electrones en el proceso de la fotosíntesis y en la respiración celular (38) En cuanto al manganeso este activa una o más enzimas en la síntesis de ácidos grasos así como es la enzima responsable en la formación del ARN y del ADN; eventualmente participando en la producción de oxígeno a partir del agua. Por último encontramos el cobre y molibdeno, quienes tendrán participación en el proceso de fijación de nitrógeno; el cobre actuará como portador de electrones, siendo parte integral de algunas enzimas y el molibdeno actuará como portador de electrones en la conversión del  $NH_2NO_3$ . (6)

## **2.6.Descripción teórica del proceso de lisis celular por el método de Fenton.**

Las microalgas son una fuente potencial de varios productos químicos valiosos para aplicaciones comerciales que van desde nutracéuticos (combinación de “nutrición” y “farmacéutico”) hasta combustibles, es por ello que la lisis celular en las microalgas corresponde a un proceso en el cual se pretende perforar la pared celular del alga permitiendo la liberación de los componentes orgánicos que generan la posibilidad de los diferentes biocombustibles; para esta ruptura, investigaciones han logrado plantear estrategias por diferentes métodos como lo son físicos, químicos y biológicos; es por ello que cuando se emplean procesos biotecnológicos para la obtención de biocombustibles y bioproductos de microalgas, uno de los pasos más críticos que afectan la economía y los

rendimientos es la etapa de "interrupción celular". El objetivo del proceso es emplear los componentes de la biomasa de manera eficiente como en el caso de las refinerías de petróleo en las que el petróleo se fracciona en combustibles y en una variedad de productos de mayor valor. (4) Los procesos posteriores en las biorrefinerías de microalgas consisten en diferentes pasos en los que la alteración celular es la parte más crucial, al igual que la funcionalidad de los productos bioquímicos de las algas durante la interrupción celular obteniendo altos rendimientos de interrupción.

El método Fenton es un proceso de oxidación avanzada que permite degradar materia orgánica, haciéndola más inocua; en esta reacción se producen radicales altamente reactivos de hidroxilo (45). La reacción de Fenton se recomienda realizarla a un pH menor de 3 dado a que a este pH, el hierro funciona mejor como catalítico y a niveles superiores de 3 el hierro empieza a precipitarse como hidróxido de hierro. (46) El radical de hidroxilo tiene una alta capacidad oxidativa y puede romper fácilmente enlaces de moléculas. Esta capacidad oxidativa es más elevada que la de muchos otros oxidantes como cloro, oxígeno o peróxido de hidrógeno y le facilita degradar muchos compuestos orgánicos e inorgánicos.

### **2.7. Generación del biocombustible para su producción masiva a partir de los compuestos orgánicos de microalgas.**

Las algas contribuyen aproximadamente la mitad de la productividad global del carbono; de igual modo se encuentran en la base de todas las cadenas alimentarias marinas, algunas cadenas alimentarias de agua dulce y una pequeña minoría de las cadenas alimentarias terrestres (29). Si bien algunas algas solo pueden crecer en la luz con una fuente de nutrientes inorgánicos, los representantes de muchos taxones superiores son mixotróficos, es decir, utilizan materiales orgánicos externos para su crecimiento, así como sustancias químicas ligeras e inorgánicas; (27) algunos de estos pueden crecer en continua oscuridad. Es por ello que el componente cuantitativamente más importante en el empleo de la biomasa algal para la producción de biodiesel son las proteínas, las cuales pueden representar hasta el 50% del peso seco total y que sumadas a los lípidos especialmente a la síntesis de triglicéridos (TG) no polares (que son el mejor sustrato para la producción de biodiesel ya que su importancia radica debido a que puede ser manipulada por cambios en las condiciones de cultivo); y a los carbohidratos que constituyen hasta el 90% del peso

seco total, mientras que los minerales, los ácidos nucleicos, los pigmentos y los demás componentes menores suman el 10% restante. (36)

Adicionalmente, las microalgas poseen algunas ventajas sobre otras materias primas disponibles, entre las que se pueden mencionar: Mayor eficiencia fotosintética que las plantas superiores debido a que su tasa de crecimiento es elevada, duplicando su biomasa en aproximadamente 24 horas, (25) logrando convertir entre el 3.0 y el 8.0 % de la energía solar en biomasa, mientras que el rendimiento observado en las plantas es de aproximadamente un 0,5 %. Adicionalmente los periodos de cultivo y crecimiento son muy cortos (menores a diez días), lo que permite múltiples o continuos cultivos; crecen casi en cualquier lugar y sólo necesitan luz del sol y algunos nutrientes. Pueden cultivarse en zonas áridas y semiáridas, donde no pueden desarrollarse cultivos agrícolas, pueden utilizar agua no potable y su cultivo no requiere la adición de herbicidas o pesticidas. Estos descubrimientos incentivan a la realización de cálculos teóricos los cuales en los cuales se establece que las microalgas tienen el potencial para producir mayor cantidad de biomasa y de aceite por hectárea que cualquier planta oleaginosa (23)

Las microalgas son capaces de fijar grandes cantidades de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), lo que permitiría acoplar su producción a una corriente de gases de combustión industrial para disminuir el efecto invernadero y contribuir al restablecimiento del equilibrio térmico del planeta; por otra parte son capaces para utilizar los nutrientes de aguas residuales en su crecimiento (especialmente nitrógeno y fósforo), podría disminuir el costo del medio de cultivo y evitar la descarga de estos nutrientes a cuerpos de agua. (3)

### **2.8. Aplicación de *Chlorella sp* en la industria**

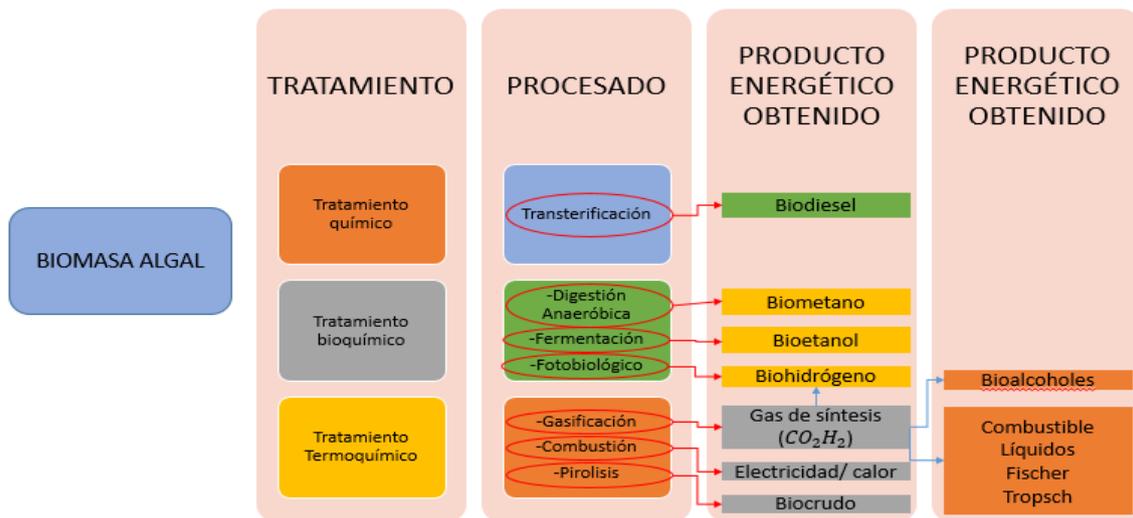
Las microalgas han obtenido una enorme importancia debido a la combinación de usos que pueden tener. Se pueden utilizar con fines energéticos, principalmente para la obtención de biodiesel aunque también se pueden obtener otros biocombustibles como bioetanol, biometano, biohidrógeno generando calor y electricidad. (9) Otras aplicaciones comerciales de las microalgas buscan obtener productos con un alto valor añadido haciendo hincapié en la nutrición y salud humanas, acuicultura, cosméticos y biofertilizantes. Además, las microalgas durante su crecimiento, reducen las emisiones de  $CO_2$  por biomitigación biológica e intervienen en el tratamiento de aguas residuales. (38) Para que estos usos sean

económicamente viables y medioambientalmente sostenibles, es necesario reducir significativamente los costes de producción y los impactos medioambientales, consiguiendo un balance energético y de  $CO_2$  favorable. (36) La biomasa residual, posterior a la extracción de los lípidos, encuentra aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica, agropecuaria e incluso en la producción de alcoholes combustibles y en la generación de energía. (23)

Una capa de material relativamente inerte, está presente en la mayoría de las células de las algas, la composición de hidratos de carbono consiste en homogéneos o heterogéneos. (37) Estas capas pueden estar impregnadas con sustancias inorgánicas tales como Carbonato de Sílice, carragenanos (polisacárido emulsionante, estabilizante y gelificante que se utiliza en la industria láctea, cosmética, farmacéutica y textil), Calcio o Magnesio (36). La pared celular puede ser modificada por la presencia de otros polisacáridos como la Pectina (Ácido Poligalacturónico), xilanos, mananos, ácido algínico (usado para fabricar geles, gomas o realizar películas protectoras y como coloide en los cosméticos), (46) y ácido fuccínico. (37)

### **2.9.Usos energéticos a partir de las microalgas**

Los valores teóricos, así como algunos valores obtenidos a escala de laboratorio o de planta piloto, ratifican la potencialidad de estas tecnologías para la obtención de biocombustibles. Sin embargo, para que estas tecnologías sean económicamente viables y medioambientalmente sostenibles, es necesario que sus balances energéticos y de carbono sean favorables de igual modo manteniendo un impacto medioambiental y unos costes de producción reducidos. (38) Los usos energéticos a partir de la biomasa algal generan gran potencial en los productos de obtención final de diferentes variedades de biocombustibles; esta obtención de productos y subproductos radican en los tratamientos o pre-tratamientos empleados en la biomasa microalgal. (Figura 7)



**Figura 7.** Principales procesos de obtención de energía a partir de la biomasa algal. Realizado por Parada Karen.

## 2.10. Biorreactores

La biotecnología de las algas se basa en su cultivo masivo con el fin de producir biomasa. En la producción actualmente existen dos diseños básicos de reactores, para la acumulación, estos son: reactores abiertos o cerrados. (47) Los reactores abiertos que están en contacto con la atmósfera; estos son los más abundantes y más antiguos, principalmente a la facilidad y economía al construirlos sin embargo presentan ciertas desventajas como: fácil contaminación del medio, difícil control de las condiciones de operación, pérdida del medio por evaporación, baja densidad celular, alta dependencia de las condiciones climáticas, entre otras; mientras que los cerrados son más recientes y presentan ventajas como: menor requerimiento de espacio, reducción en la contaminación del cultivo por organismos no deseados, flexibilidad en la producción, entre otras. Pero presentan desventajas como; su alto costo y la dificultad de ser estandarizados en la producción a gran escala. (46) Existe una variedad de diseños de reactores abiertos para el cultivo masivo de microalgas, Estos sistemas se basan en un esquema similar de superficie variable y profundidad por lo general inferior a 50 cm. Los fotobiorreactores cerrados también presentan varios diseños (los tubulares: horizontales, de planos inclinados o verticales). Sin embargo presentan difusores de aire en el fondo, como los fotobiorreactores Airlift con tubos concéntricos. (47) (Ver tabla 4)

Estos tipos de biorreactores pueden ser construidos en diversos materiales como vidrio, acrílico o fibra de vidrio de alta transparencia, lo que los hace costosos, ya que implementar esta tecnología a gran escala se dificulta porque el almacenamiento de líquido se encuentra limitado por el diámetro de los tubos, pese a ello su disposición geométrica es capaz de tratar mayor volumen por área a diferencia de los reactores inclinados y horizontales que requieren mayor área para tratar el mismo volumen y que difícilmente se pueden extender en altura. (47) Los reactores verticales de burbujeo que pueden ser también de diferentes tipos: airlift, columna de burbujeo y Split (cilindros divididos). Entre éstos, la columna de burbujeo alcanza mayores rendimientos en la producción de biomasa, ya que su eficiencia se eleva al aumentar la aireación del sistema. (48)

Los bioreactores planos favorecen la absorción de la luz, ya que este tipo de configuración permite construir reactores donde la trayectoria de la luz puede ser más corta, favoreciendo la absorción de la luz, necesaria para la fotosíntesis y la reproducción de las microalgas. Para lograr cultivos de ultra alta densidad celular (UADC) se han utilizado diversas geometrías de fotobiorreactores y fuentes de iluminación, tales como reactores planos verticales con lámparas fluorescentes de luz blanca, reactores iluminados cuasi-internamente por diodos, reactores iluminados internamente mediante fibra óptica, y reactores planos inclinados con iluminación solar mantenidos en exteriores. (4) (Tabla 4)

CONDICIÓN	SISTEMA CERRADO	SISTEMA ABIERTO
Control de contaminación	Fácil	Difícil
Riesgos de contaminación	Reducido	Alto
Esterilización	Posible	Imposible
Control de proceso	Fácil	Difícil
Mezcla	Uniforme	Muy pobre
Régimen de operación	Batch o semicontinuo	Batch o semicontinuo
Espacio requerido	Menor	Alto
Relación área/volumen	Alta ( $20-200m^{-1}$ )	Baja ( $5-10m^{-1}$ )
Población densidad celular	Alta	Baja
Costos de operación	Altos	Altos
Eficiencia de absorción de luz	Alta	Baja
Control de temperatura	Más uniforme	Difícil

Productividad	3-5 veces más	Baja
Evaporación del medio	Baja	Alta

**Tabla 4.** Comparación entre biorreactores cerrados y abiertos. Tomado de Rendón Leidy et al, 2013, Microalgas para la industria alimenticia. (36)

En los procesos industriales, es importante tener en cuenta la finalidad del bioreactor; generación de energía (crecimiento o acumulación de biomasa), acumulación de metabolitos secundarios, producción de enzimas en el cultivo para industria alimenticia, salud humana y animal o si el proceso implica la combinación. Esto requiere mantener condiciones óptimas, como la presión parcial de oxígeno; presión parcial de dióxido de carbono, la agitación y mezclado, la densidad del cultivo, la temperatura y la iluminación. (33) (Tabla 4)

En la presente investigación se empleó un reactor cerrado tipo Airlift con columna de burbujeo concéntrico para la producción de biomasa y uno tipo UASB para la producción de gases.

### **2.11. Operación de los Biorreactores**

Los biorreactores se establecen según su funcionamiento de fermentador; siendo clasificados de acuerdo al modo de operación, los cuales son:

- Sistemas cerrados; caracterizados por cambiar las condiciones fisiológicas te tipo de biorreactores no hay entrada ni salida del medio de cultivo.
- Sistema alimentados: Estos sistemas operan adicionando medio fresco, pero sin remoción del existente. Son útiles cuando se requiere una elevada densidad celular en la etapa de iniciación del proceso que implica alto consumo de nutrientes, como lo es la fuente hidrocarbonada que suele emplearse como sustrato limitante. (49)
- Sistema alimentado semicontinuo: Consiste en remover entre un 80% a 90% del cultivo y ser reemplazado por medio fresco. De este modo puede satisfacerse sencillamente la necesidad de contar con inóculos de gran tamaño y a su vez evitar la esterilización entre dos ciclos. (49)
- Sistema Continuo: En este caso el caudal de entrada de medio fresco es igual al de salida de medio utilizado. Son empleados comúnmente en cultivos en sonde la

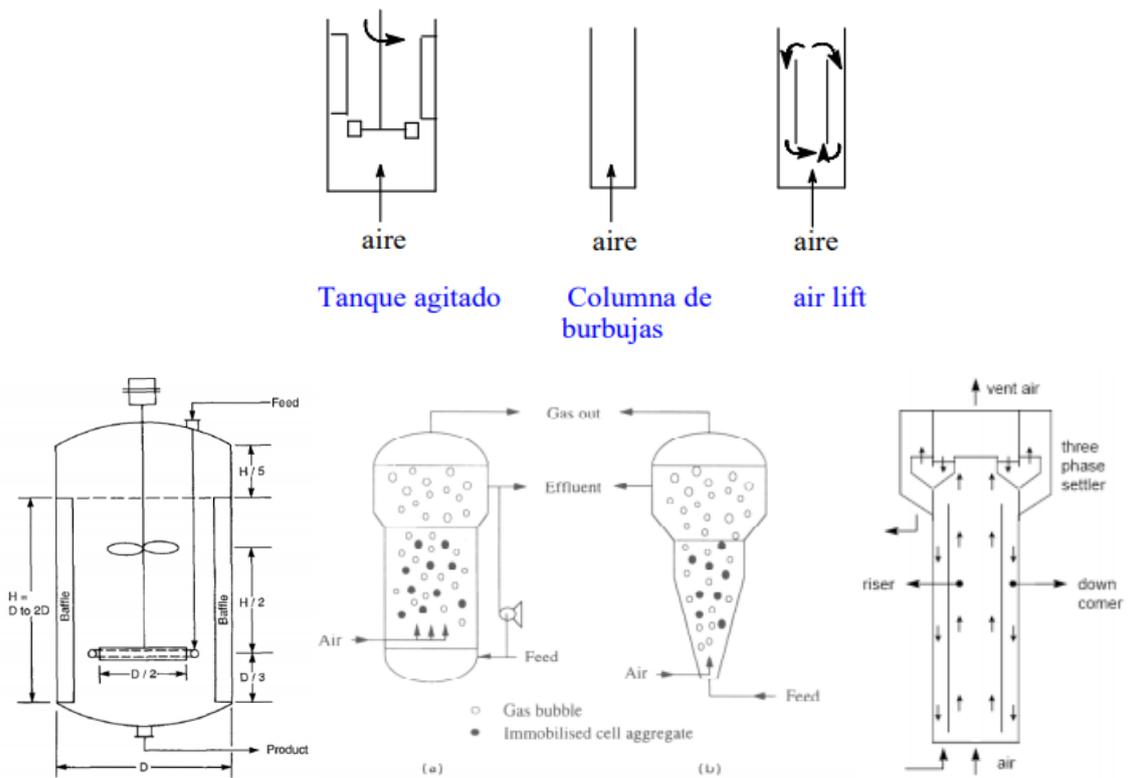
velocidad de crecimiento celular sea constante, por lo que existe un suministro constante de nutrientes o para la remoción permanente de un producto; se destaca en aquellos sistemas que suelen ser inmovilizados. (49)

Para la operación de los biorreactores se deben tener en cuenta distintos factores para el control del crecimiento algal, estos son:

### **Agitación**

Para la fabricación y mantenimiento de los biorreactores hay que estimar la agitación ya que de esta depende la transferencia de oxígeno; al aumentar el área de transferencia de oxígeno se presentaran pequeñas burbujas que garantizan la oxigenación en todo el biorreactor, retardando el escape y coalescencia de burbujas y disminuyendo la interface gas-liquido al crear un flujo turbulento. En el caso de estimar la agitación como factor de transferencia de masa, se asegura el suministro de nutrientes a nivel celular, se previene la sedimentación, se asegura la transferencia de gases siendo capaz de solubilizar componentes menos solubles de los medios convencionales para algas. (34)

Existen tres diseños básicos de biorreactores para múltiples propósitos, por ejemplo. El Tanque agitado o reactor intermitente (Batch) es usado en investigación cinética o en procesos industriales, siendo un reactor con un agitador que homogeneiza la mezcla, reactor columna de burbujeo (riser o upflow) carece de transmisión mecánica para mezclar el cultivo, siendo un contenedor cilíndrico con un eyector de gas en el fondo y el reactor Airlift son reactores sumergidos en los que el suministro de energía se realiza mediante absorción de gas. Para la absorción de gas a menudo se utiliza aire comprimido; el aire comprimido entra al reactor Airlift desde abajo por el distribuidor de gas. El aire suministrado se mezcla con el contenido del reactor y asciende en forma de burbujas de aire. (Figura 8) Los reactores Airlift se diferencian de los de columnas de burbujeo, porque en ellos las corrientes de flujo ascendentes se separan físicamente de las descendentes.



**Figura 8.** Diseño básico de biorreactores para múltiples propósitos. Tomado de Principios de Ingeniería de Bioprocesos (49)

El empleo o adaptación del sistema continuo presenta algunas desventajas o inconvenientes principalmente al mantenimiento de las condiciones de asepsias durante el proceso y su dificultad para formar agregados de células vegetales en el cultivo y lento crecimiento celular. Para el adecuado funcionamiento se debe suplementar continuamente el medio de cultivo evitando de ese modo la remoción de células a causa del “lavado” del cultivo.

### 3. DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.1. Universo, población y muestra.

**Universo:** Microalgas

**Población:** Microalgas del género *Chlorella sp*

**Muestra:** Cultivo de Microalgas del género *Chlorella sp*, obtenidas del laboratorio de ingeniería ambiental de la universidad Antonio Nariño

**Tipo de estudio:** El trabajo realizado corresponde a una investigación experimental exploratoria; se realizó para obtener más información respecto al pretratamiento Fenton en microalgas y así posteriormente realizar investigaciones más específicas; enfocado a un diseño explicativo donde se identificó la alternativa para la generación de biogás a partir de microalgas; el desarrollo del estudio fue mediante el análisis estadístico descriptivo en donde se evaluó la producción de biogás a partir de la ruptura de la pared celular mediante el pre-tratamiento Fenton.

#### 3.2. Hipótesis, variables e indicadores

**Hipótesis.** El Fenton como pre-tratamiento en la biomasa algal al generar la ruptura en la pared celular incentiva la liberación de los componentes orgánicos, lo cual garantiza un aumento en la producción de biogás.

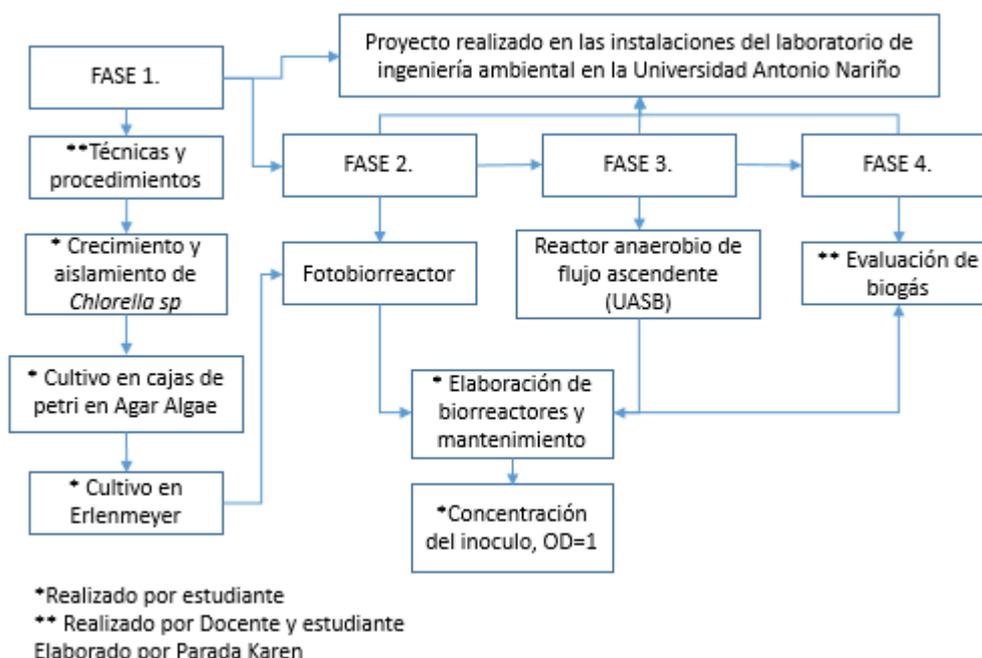
**Variabes e Indicadores**

<b>TIPO DE VARIABLE</b>	<b>INDICADOR</b>	<b>DEFINICIÓN TEÓRICA</b>	<b>CLASIFICACIÓN DEL INDICADOR</b>
<b>Dependiente</b>	Viabilidad microalgal	Adaptabilidad de microalgas del género <i>Chlorella sp</i> en biorreactores.	<b>Cualitativo y cuantitativo</b>
<b>Independiente</b>	Temperatura	Microalgas a temperatura de 37°C	<b>Cuantitativo</b>
<b>Independiente</b>	Tiempo	Crecimiento e incubación de microalgas durante 5 a 7 días	<b>Cuantitativo</b>
<b>Independiente</b>	Intensidad de luz	Incidencia de luz natural o artificial constante.	<b>Cualitativa</b>
<b>Dependiente</b>	Identificación morfológica de las microalgas	Se determina la forma y tamaño mediante observación microscópica	<b>Cualitativa</b>
<b>Dependiente</b>	Recuentos de microalgal en cámara de Neubauer	Cantidad de células de microalgas por mm <sup>3</sup> .	<b>Cuantitativa</b>
<b>Dependiente</b>	Evaluación del proceso Fenton	Determinación de liberación de proteínas	<b>Cuantitativo</b>
<b>Dependiente</b>	Sólidos totales en seco	Valoración de la biomasa algal en peso seco	<b>Cuantitativo</b>
<b>Dependiente</b>	Lodo granular	Para objeto de este estudio se utilizó la concentración de lodo granular de 100ml	<b>Cuantitativo</b>

Dependiente	Producción de biogás	Determinación de biogás medido en cm <sup>3</sup>	Cuantitativa
-------------	----------------------	---------------------------------------------------	--------------

**Tabla. 5.** Determinación de indicadores dependientes e independientes como objeto de estudio. Elaborado por Parada Karen

### 3.3. Técnicas y procedimientos

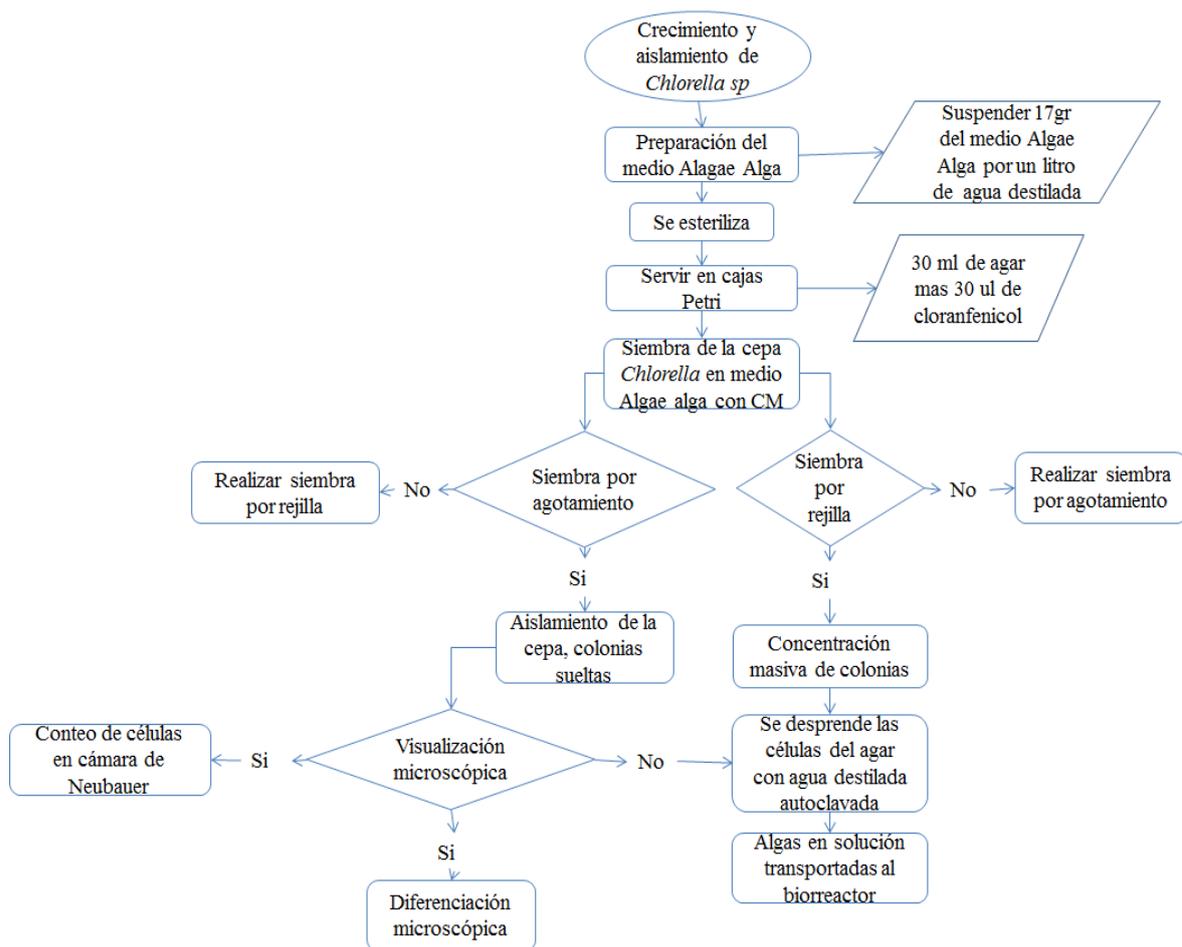


**Figura 9.** Fases de intervención directa en las fases del proyecto investigativo. Elaborado por Parada Karen

#### 3.3.1. Crecimiento y aislamiento de *Chlorella sp*

Para la siembra inició con un cultivo previo de las microalgas (*Chlorella sp*) obtenido de las instalaciones del laboratorio de ingeniería ambiental de la universidad Antonio Nariño. La muestra fue sembrada de dos formas: siembra rejilla y/o siembra masiva, la primera se realiza con el fin de aislar la cepa, para evitar la contaminación de otros agentes microbiológicos y la segunda con propósito de poder obtener gran cantidad de células de *Chlorella sp*. (Ver figura 10)

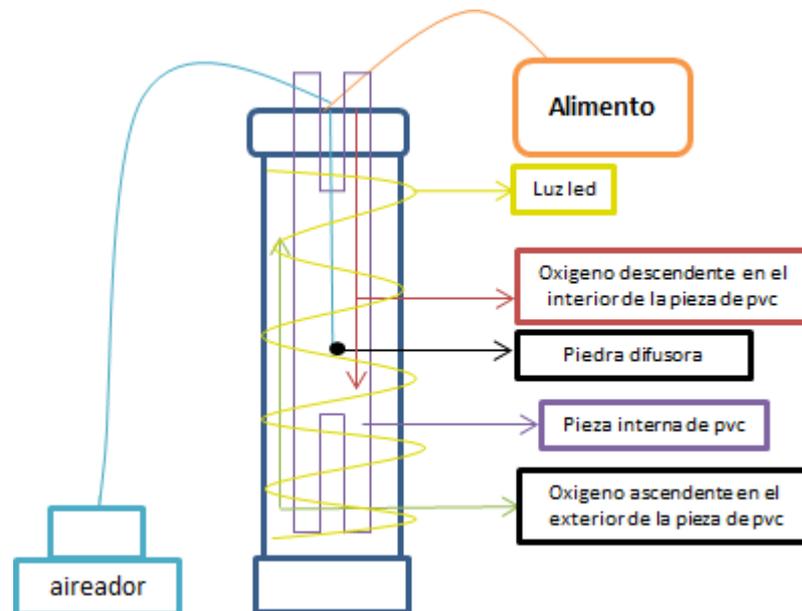
De igual modo para evitar el crecimiento de bacterias se agregó cloranfenicol (CM) 0,15% (antibiótico bacteriostático de amplio espectro). (Ver anexo 1)



**Figura 10.** Metodología para el crecimiento y aislamiento de las células de microalgas *Chlorella sp*

### 3.3.2. Fotobiorreactor

El fotobiorreactor consiste en un tubo de plástico o resina concéntrico el cual permite la visualización y tonalidad de las microalgas, este debe tener un diámetro adecuado en el que se genere un ambiente apto para la viabilidad de las algas; dentro del mismo se requiere de una piedra difusora la cual estará conectada a una manguera que comunica al aireador de este modo permite la entrada del oxígeno mediante un burbujeo en un flujo constante esto se logra debido a que en el interior hay una pieza en este caso hecha de tubo pvc con unos cortes específicos que permite que el aire se genere de forma descendente en el interior del tubo y ascendente en el exterior del mismo, recuperando y otorgando oxígeno a todas las células dentro del sistema. (Figura 11)



**Figura 11.** Esquema del funcionamiento y operación del prototipo del fotobiorreactor. Diseñado por Dr Juan Valderrama, 2019, investigador perteneciente al laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Univesidad Antonio Nariño. Figura realizada por Parada Karen

En la parte superior del biorreactor se encuentra conectada una manguera la cual comunica al alimento, este es la composición de agua y orina (8ml de orina por cada litro de agua). La manguera debe ir enrollada en cinta negra para evitar el crecimiento de las algas ya que estas pueden taponar la comunicación del alimento al reactor. El alimento está configurado por un circuito electrónico el cual permite la apertura de la bomba y garantiza que este tenga constante paso según los tiempos establecidos (Figura 11)

En la parte externa del fotobiorreactor se encuentra enrollada una cinta de luz led la cual le permite a las algas llevar su proceso de fotosíntesis que garantice su crecimiento y producción de biomasa. (Figura 11)

### 3.3.3. Conteo en cámara de Neubauer

La lectura en cámara de Neubauer se realizó a distintas diluciones. Se tomó de cada dilución 20  $\mu\text{L}$ , las cuales fueron visualizadas en la cámara Neubauer; las diluciones se realizaron de tal modo para poder establecer una correlación en cuanto a la absorbancia y de ese modo lograr cuantificar las células por milímetro cúbico ( $\text{mm}^3$ ). Así mismo se empleó el agua destilada como diluyente para las diluciones propuestas; se le realizó la

lectura mediante espectrofotometría. Tal como se observa en la tabla 6 se registraron 4 diluciones y la muestra pura sin diluir, estableciendo las concentraciones exactas a las cuales se concentró la muestra de microalgas con el agua destilada del mismo modo se enunciaron las OD correspondientes a cada dilución.

### 3.3.4. Fórmula general para el cálculo de conteo celular en cámara de Neubauer

$$\frac{\text{Células}}{\text{mm}^3} = (\text{Número de células contadas})(\text{Factor de dilución}) \left( \frac{1}{\text{Factor de volumen}} \right)$$

En la formula general para el cálculo del conteo celular en cámara de Neubauer se tiene en cuenta que el número de células contadas, corresponde a la suma total de los 4 cuadrantes pertenecientes a la cámara; el factor de dilución corresponde a las diluciones mencionadas en la tabla 6, y por último el factor de volumen corresponden a los 20  $\mu\text{l}$  tomados de la muestra para la estimación celular en la cámara de Nuebauer. Del mismo modo se determinó la cantidad de células por cuadrante de cada una de las diluciones incluyendo la muestra pura, y a partir de la fórmula general para el cálculo del conteo celular en cámara de Neubauer; este método permitió definir la cantidad de células por milímetro cúbico que se encontraba en cada dilución siendo un dato orientador para establecer la proporcionalidad de producción de biogás a partir de la concentración celular en determinado volumen.

### 3.3.5. Determinación de peso en seco

Para el cálculo del peso seco de la biomasa algal se tomaron tres falcon de 50 ml de la muestra obtenida del Erlenmeyer a una densidad óptica (OD) igual a 1 ( $475,4 \text{ células/mm}^3$ ). Las muestras fueron centrifugadas a 4500 r.p.m durante 15 minutos y se resuspendieron con 1.0 ml de agua destilada en las cápsulas de porcelana; posterior a ello fueron dejadas en el horno desecador durante 24 horas; al cabo del tiempo se calculó el peso de dichas cápsulas. (Ver tabla 8)

### 3.3.6. Aplicación del pre-tratamiento Fenton

El tratamiento Fenton fue aplicado a 3 de los pellet que se encontraban en los Falcón añadiéndole a cada uno 2800 $\mu\text{l}$  de  $\text{FeSO}_4$  se procuró que el pellet se disolviera en el reactivo con la misma pipeta, una vez diluido completamente se le agrego 200 $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dejándolo reaccionar durante 6 minutos, al cabo del tiempo la reacción fue frenada con

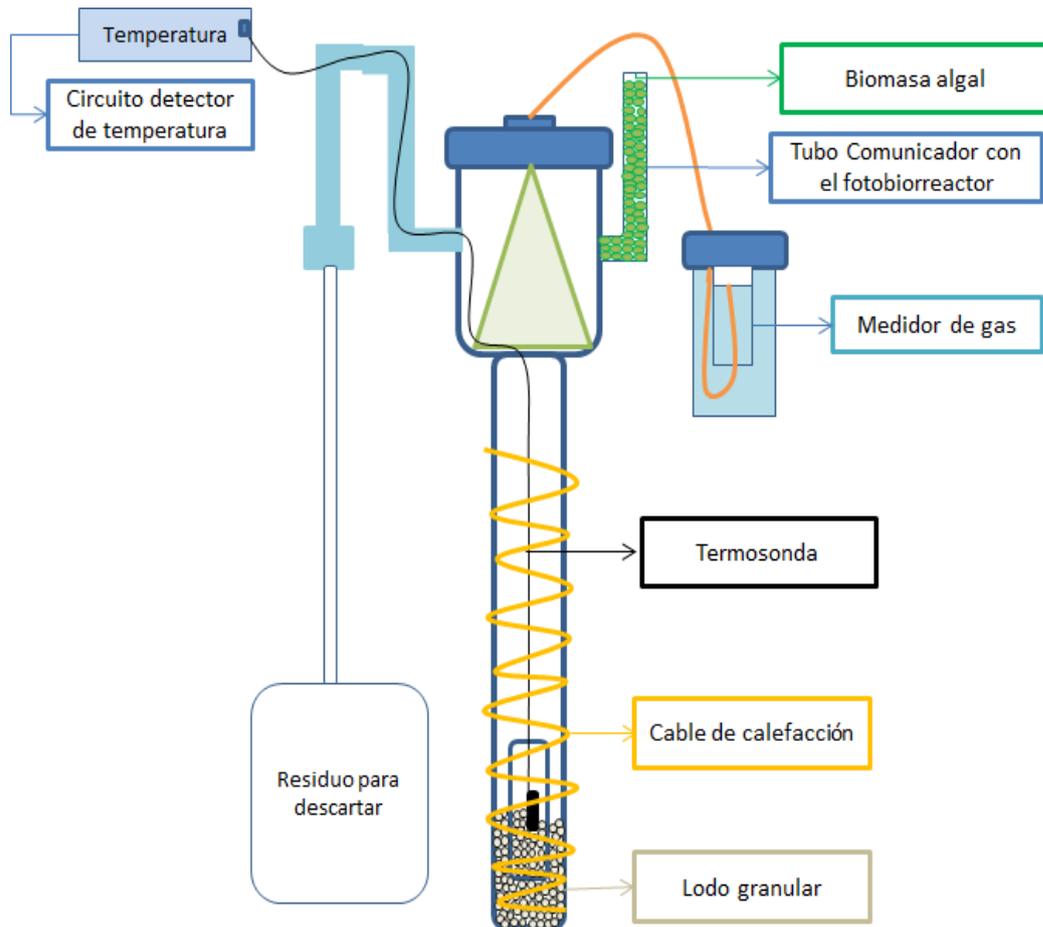
400µl de bisulfito ( $NaHSO_3$ ) en solución, permitiendo neutralizar la reacción. Para este ensayo se aseguró la mezcla homogénea de los compuestos con la biomasa por movimientos invertidos. Se volvieron a centrifugar los 3 Falcon durante 15 minutos a 4500 r.p.m.

Para verificar si se presentó ruptura de la membrana celular se cuantificó la concentración de proteínas con el método Bradford luego del tratamiento. Se tomó el sobrenadante de tres (3) tubos Falcon centrifugados previamente, se procedió a realizar la lectura en el espectrofotómetro a 595 nm, en muestras preparadas con 200µl del sobrenadante (muestra) y 2.0 ml de reactivo Bradford.

### **3.3.7. Reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB)**

El fotobiorreactor posee una conexión directa al UASB (reactor anaerobio de flujo ascendente) mediante una manguera o tubo el cual transporta la biomasa algal de un reactor a otro; en este proceso se determinó la absorbancia mediante la densidad óptica, ya que permitió determinar la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, en este caso la concentración de células (*Chlorella sp*) en determinado volumen una vez.

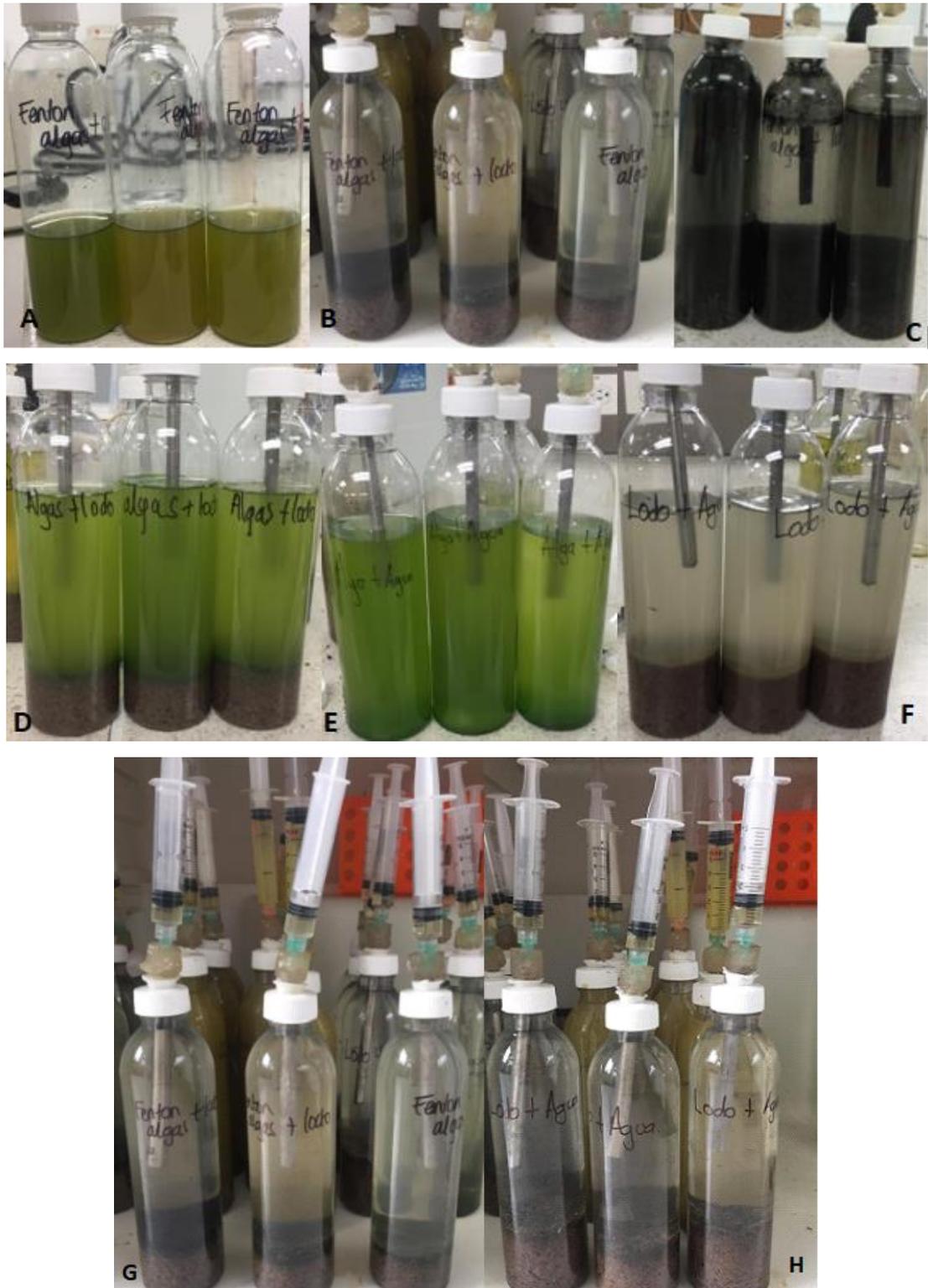
Este biorreactor contiene agregados celulares con material orgánico (lodos de aguas residuales) el cual produjo (debido a la interacción de agentes bacterianos) la lisis de la pared celular de la alga; al igual que el fotobiorreactor debe tener dos sondas térmicas, una que detecte la temperatura al interior de UASB, y otra que rodea la mitad del reactor hacia abajo donde se encuentra ubicado el lodo granular, en la parte superior encontramos un cono que es el encargado de capturar el gas (metano) producido por la interacción entre los microorganismos en dicho ambiente; este gas es comunicado por una manguera a un recipiente que contiene agua el cual nos garantiza visualizar el desplazamiento del agua por la acción de la presión del gas. (Figura 12)



**Figura 12.** Esquema del proceso y operación del bioreactor UASB. Realizado por Parada Karen.

### 3.3.8. Evaluación en la producción de biogás

Para cuantificar el biogás producido, se prepararon 3 botellas de 250 ml que contenían el pellet de 100 ml de biomasa algal resuspendida en 50 ml de agua destilada, a la cual se le había realizado la reacción de Fenton, a este mismo ensayo se le adicionaron 100 ml de lodo granular (el cual simuló el funcionamiento del bioreactor tipo UASB anaerobio) completando la botella con agua destilada hasta el tope para garantizar un cierre hermético (figura 13). Como controles se montaron otras 9 botellas; tres botellas con algas sin tratamiento Fenton, tres botellas con solo lodo granular y botellas con algas sin tratamiento Fenton y lodo granular. Estos mismos completados con agua destilada hasta el tope y se dejaron incubadas a 37°C durante dos semanas.



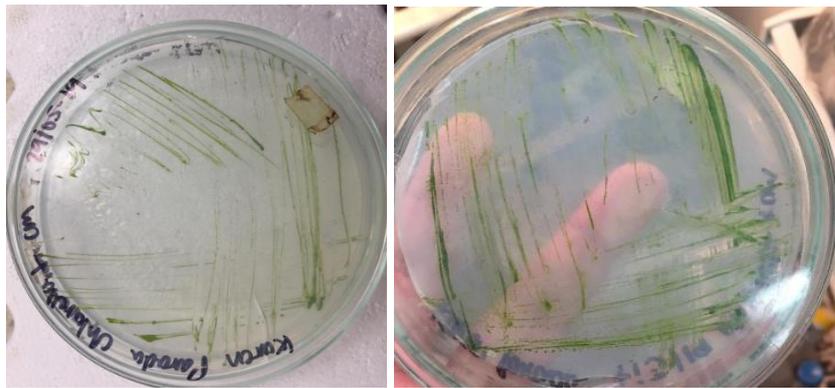
**Figura 13.** Montaje de los ensayos para la medición de biogás en botellas de 250ml. Tal como se muestra en la imagen A,B y C representan el proceso de disposición de la reacción Fenton en las botellas de 250ml; la imagen A describe el paso de la reacción Fenton correspondiente a un pellet de 100ml en la botella de 250ml, en la imagen B es el proceso en el cual fue añadido el lodo granular (volumen de 100ml) completado hasta el tope con

agua destilada y en la imagen C se destaca el funcionamiento de la reacción Fenton en la botella simulando el proceso ocurrido en el biorreactor tipo UASB. El cambio de color es propio de la acción generada por la lisis celular y como resultado acumulación de biogás en la jeringa que sobresale de la botella. Para la imagen D, E y F, describen los otros controles que se emplearon para la evaluación del biogás generado. En la imagen D se concentraron 100ml de algas sin tratar más 100ml de lodo granular completando hasta el tope con agua destilada, en la imagen E solo se empleó 100ml de algas completado con agua destilada hasta el tope y por último la imagen F se empleó 100ml de lodo granular completado con agua destilada hasta el tope. Los ensayos fueron incubados a 37° durante dos semanas. La imagen G y H corresponden al diseño de la botella la cual tiene un cerrado hermético de que sobresale de la tapa un jeringa que nos permitió realizar el conteo y cuantificación del biogás. En todos los ensayos se agregó en la jeringa aceite para evitar la evaporación del líquido y cuantificar el recorrido del mismo a causa de la presencia de gas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Aislamiento de las células de microalgas (*Chlorella sp*) en medio Algae Agar.

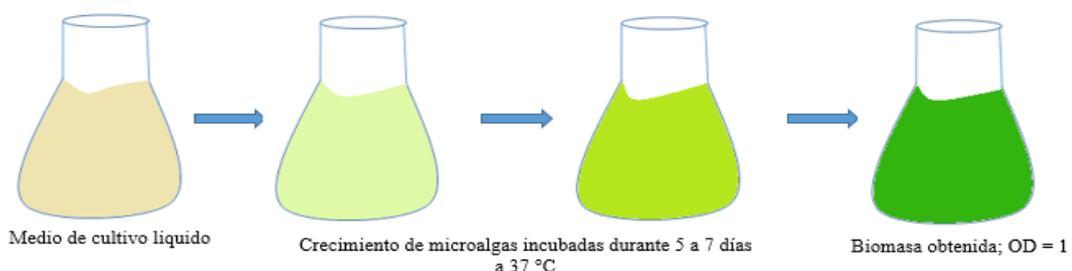
Las células de *Chlorella sp* fueron cultivadas en cajas Petri (previamente autoclavadas) con agar Algae Agar con adición de cloranfenicol como antibiótico, se dejaron incubadas de 3 a 5 días a una temperatura de 37°C, evidenciando su crecimiento. La siembra se realizó tanto por rejilla como por siembra masiva. (Figura 14) (Ver anexo 1)



**Figura 14.** Aislamiento de microalgas (*Chlorella sp*) en Algae Agar con cloranfenicol. Realizado por Parada Karen

### 4.2 Traspaso de las células *Chlorella sp* en cultivo líquido para obtención de biomasa.

Inicialmente se utilizó un Erlenmeyer de 500 ml en el cual se preparó medio líquido preparado de tal forma que se empleó 8 ml de orina autoclavada por cada litro de agua destilada. El crecimiento de microalgas en el medio líquido tardó entre 5 a 7 días en una incubadora a 27°C, manteniendo evaluado el crecimiento de las microalgas mediante espectrofotometría. Finalmente se determinó un valor de OD igual a 1 para las pruebas subsiguientes (Figura 15)



**Figura 15.** Proceso de crecimiento e incubación de las microalgas (*Chlorella sp*) en cultivo líquido. La representación expresa de izquierda a derecha la preparación inicial del cultivo líquido y el crecimiento de las microalgas en el mismo a través del tiempo, se establecen como factores primordiales la temperatura, el volumen del medio para su crecimiento y la aireación del medio. Realizado por Parada Karen.



**Imagen A      Imagen B**

**Figura 16.** Crecimiento de *Chlorella sp* en Erlenmeyer de 500ml y 1000ml en cultivo líquido incubado a 37°C. (Imagen A) crecimiento de las microalgas a los 3 días de haber sido incubado, OD igual a 0.502 (Imagen B) crecimiento de las microalgas a los 7 días de haber sido incubada, OD igual a 1. Realizado por Parada Karen

Para el traspaso de las células de *Chlorella sp* se procedió a tomar 3.0 ml del cultivo líquido previamente auto clavado en un Erlenmeyer de 500ml, traspasando los 3.0 ml del cultivo sobre la caja Petri previamente incubada y con crecimiento considerable de la microalga. Las microalgas fueron resuspendidas en el medio líquido con ayuda de un asa para su disolución y posteriormente fueron trasladadas al erlenmeyer que contenía el cultivo líquido; para la obtención de la biomasa se incubaron los erlenmeyer durante 5 a 7 días a 37°C, asegurándose de la aireación del cultivo líquido; de igual modo se mantuvo controlado la cantidad de células en el medio a partir de la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro con una densidad óptica (OD) de 1.

#### **4.3 Conteo celular de microalgas en cámara de Neubauer**

El conteo en cámara de Neubauer se realizó para poder correlacionar la cantidad de células/mm<sup>3</sup> con respecto a la absorbancia obtenida mediante espectrofotometría. Los

resultados obtenidos se enuncian en la tabla 6, en donde se destacan las diluciones que se emplearon para la determinación del conteo celular y sus absorbancias correspondientes

[ ] Muestra de microalgas del Erlenmeyer, OD = 1	[ ] Agua para realizar la dilución	[ ] Dilución en Cámara de Neubauer	[ ] Dilución en Cámara de Neubauer	Absorbancia a 675nm
Muestra pura, tomada directamente del Erlenmeyer	0ml $H_2O$	1	1,0	1
4,5ml	1,5 ml $H_2O$	4,5/6	0,75	0,416
4ml	2.0ml $H_2O$	2/3	0.66	0.821
3ml	3.0ml $H_2O$	1/2	0,5	0.618
1ml	9.0ml $H_2O$	1/10	0,1	0.136

**Tabla 6.** Distribución de las diluciones empleadas para el posterior conteo celular en cámara de Neubauer. Elaborado por Parada Karen.

En la tabla 7 se destaca el conteo celular, de las diluciones como de los cuadrantes a determinar; obteniendo un equivalente aproximado de la cantidad de células en específico por cada dilución y su concentración en términos de densidad óptica

MUESTRAS	NÚMERO DE CÉLULAS POR CUADRANTE				TOTAL DE CÉLULAS	Células/ $mm^3$
	I	II	III	IV		
Muestra sin dilución OD=1	2439	2368	2331	2370	9508	475,4
Dilución 1/33	1487	1584	1512	1558	6141	9,30
Dilución 1/5	1502	1387	1409	1389	5687	56,87
Dilución 1/1	1145	954	1217	1044	4360	109
Dilución 1/10	230	324	229	211	994	4,97

**Tabla 7.** Resultado del conteo de células de microalgas (*Chlorella sp*) empleando la fórmula general para el conteo celular en cámara de Neubauer (Ver anexo 5). Elaborado por Parada Karen.

[ ] Dilución visualizada en Cámara de Neubauer	Células/mm <sup>3</sup>	Coefficiente de correlación de Pearson
1,0	475,4	0,96
0,75	9,3	
0,66	56,87	
0,5	109	
0,1	4,97	

**Tabla 8.** Determinación del coeficiente de Pearson en dos variables cualitativas. Elaborado por Parada Karen.

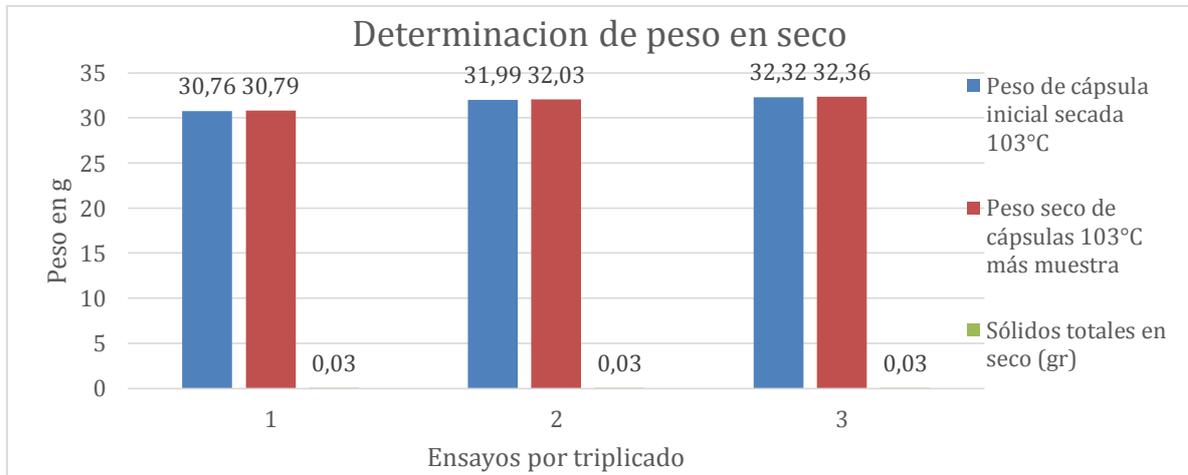
Como se enuncia en la tabla 8, se cuantificó el coeficiente de correlación de Person para las variables: concentración de la dilución visualizada en cámara de Neubauer y células/mm<sup>3</sup>; esta relación establece un índice correspondiente a  $P_{x,y}$  0,96; siendo un valor interpretado como:  $0 < 0,96 < 1$ ; por lo tanto, la interpretación del índice establece una correlación positiva y por ende una dependencia entre las dos variables, refiriéndose que cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante. Cabe resaltar que al no tener un índice de correlación igual a 1 la correlación positiva no es perfecta y por ende su proyección puede ser variable.

#### 4.4 Peso en seco de la Biomasa Algal

Los siguientes resultados enunciados en la tabla 8 corresponden a 3 muestras cada una de 50ml de microalgas, las cuales fueron evaluadas por espectrofotometría y concentradas a una densidad óptica (OD) igual a 1. El ensayo se evaluó por triplicado para poder comparar los resultados correspondientes a los sólidos totales, el cual fue realizado en un horno seco. Los valores obtenidos establecen de un promedio correspondiente a 0,03 g de peso total en seco de una biomasa de 150 ml de microalgas.

Muestra total (ml)	OD	Peso de cápsula inicial secada 103°C	Peso seco de cápsulas 103°C + muestra	Sólidos totales en seco (g)
50	1	30,7619	30,7955	0,0336
50		31,995	32,0306	0,0356
50		32,3288	32,3635	0,0347
<b>PROMEDIO</b>	<b>1</b>	<b>31,69</b>	<b>31,72</b>	<b>0,03</b>

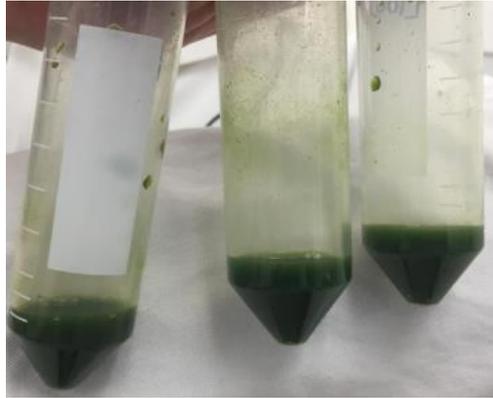
**Tabla 9.** Datos obtenidos de las muestras de microalgas (*Chlorella sp*) después de haber sido incubadas en el horno secador. Elaborado por Parada Karen.



**Figura 17.** Comparación del peso de las cápsulas de porcelanas y sus valores respectivos para la determinación de peso seco. En la siguiente gráfica se permite comparar los pesos entre la cápsula inicial secada a 103°C y el peso en seco de cápsulas de porcelana a 103°C más la muestra, por lo que se puede determinar la diferencia entre los pesos de las capsulas de porcelana correspondientes a 0,034 gr siendo este el valor promedio de los ensayos realizados por triplicado de los sólidos totales a partir de una muestra de microalgas cuya densidad óptica es igual a 1, con una concentración de  $células/mm^3$  correspondiente a 475,4. En este ensayos cabe resaltar que la determinación total de solidos secos corresponden principalmente a la cantidad de compuestos orgánicos con altos porcentajes en cuanto a proteínas y lípidos que se encuentran en la biomasa algal.

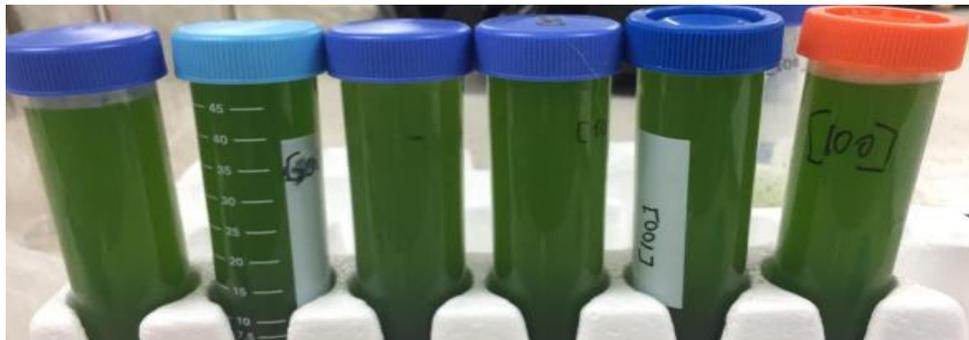
#### **4.5 Evaluación del método Fenton en la producción de biogás en ensayos a escala de laboratorio, simulando el proceso en el biorreactor tipo UASB**

Para el siguiente experimento se obtuvo del fotobiorreactor (realizado con anterioridad la lectura de la densidad óptica OD igual a 1 evaluado mediante el equipo de espectrofotometria) 18 tubos Falcon de 50 ml, de los cuales se centrifugaron 9 durante 15 minutos a 4500 r.p.m, una vez centrifugados se procedió a descartar el sobrenadante y se traspasó el pellet a los otros Falcón con 50ml para obtener un volumen total de algas correspondientes a 100ml (Figura 18)



**Figura 18.** Concentración del pellet de microalgas *Chlorella sp* después de haber sido centrifugadas a 4500 r.p.m. durante 15 minutos.

Una vez obtenido el volumen de 100 ml en los 9 Falcón se procedió a centrifugarlos durante 15 minutos a 4500 r.p.m; y se descartó el sobrenadante. El pellet que correspondía a un volumen de 100 ml fue tratado con la reacción Fenton. (Figura 19)



**Figura 19.** Concentración de pellet de microalgas *Chlorella sp* a un volumen final de 100ml

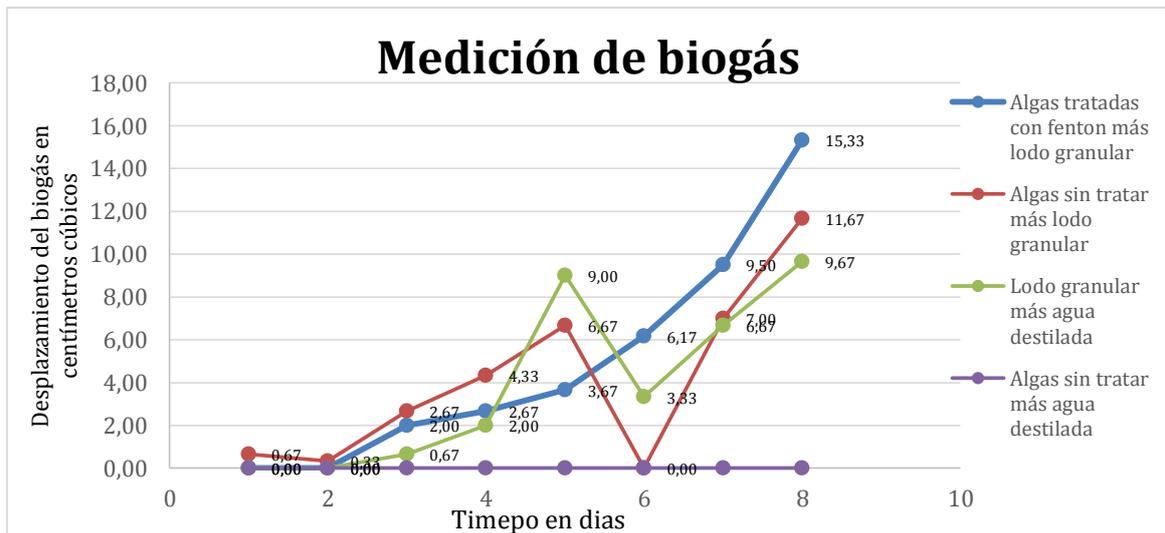
Los valores correspondientes a las muestras tratadas con Fenton, fueron evaluadas mediante el método Bradford el cual indico la ruptura de la pared celular y por ende la liberación de proteínas alrededor de los 100mg/L que correspondía a 1250ul de BCA (albumina bovina sérica); esto es relevante principalmente a que valida la prueba al determinar la ruptura de la membrana celular y por ende liberación de los compuestos orgánicos, específicamente las proteínas que fueron medidas bajo esta técnica. (Tabla 10)

Muestra	Absorbancia 595nm	$\bar{X}$ reacción Fenton
Blanco	0	0
Fenton 1	0.078	
Fenton 2	0.066	0.0723
Fenton 3	0.073	
BCA 1250ul	0.054	0.054
BCA 5000ul	0.653	0.653

**Tabla 10.** Lectura del método Fenton mediante el ensayo Bradford a una absorbancia de 595nm.

Semana	Día	Desplazamiento en cm correspondiente a la medición de biogás															
		Algas tratadas con Fenton más lodo granular			$\bar{X}$	Algas sin tratar más lodo granular			$\bar{X}$	Lodo granular más agua destilada			$\bar{X}$	Algas sin tratar más agua destilada			$\bar{X}$
1	1	0	0	0	0,00	2	0	0	0,67	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
	2	0	0	0	0,00	1	0	0	0,33	0	0	0	0,00	0	0	0	0,00
	3	3	0	3	2,00	4	2	2	2,67	1	0	1	0,66	0	0	0	0,00
	4	1	0	7	2,67	7	6	0	4,33	5	0	1	2,00	0	0	0	0,00
2	5	3	0	8	3,67	10	6	4	6,67	12	5	10	9,00	0	0	0	0,00
	6	6	4,5	8	6,17	0	0	0	0,00	4	3	3	3,33	0	0	0	0,00
	7	6	4,5	18	9,50	10	0	11	7,00	8	3	9	6,66	0	0	0	0,00
	8	6	20	20	15,33	15	5	15	11,67	12	5	12	9,66	0	0	0	0,00

**Tabla 11.** Desplazamiento del biogás, como factor medible en los diferentes ensayos montados. El siguiente experimento determina el desplazamiento del biogás en centímetros cúbicos de los ensayos previamente enunciados. Estos ensayos fueron incubados durante dos semanas a 37°C. Se destaca la acción de la reacción Fenton puesto que durante las dos semanas presento un crecimiento proporcional en comparación a los otros ensayos.



**Figura 20** Comparación de los ensayos de producción y desplazamiento del gas en centímetros cúbicos durante 8 días.

De los resultados obtenidos en esta investigación se puede deducir que en la figura 19 se observa el comportamiento del gas en los distintos ensayos. Teniendo en cuenta el desplazamiento del biogás ( $cm^3$ ) en el periodo establecido, observando lo siguiente:

Las algas tratadas con Fenton tienen un crecimiento en aumento el cual es directamente proporcional al tiempo establecido, en condiciones de temperatura de incubación a  $37^{\circ}C$ , adicionalmente la exposición en lúmenes artificial permanece constante (sin medición específica) de modo tal que afectan directamente la calidad y cantidad del volumen producido durante el proceso con un resultado final al octavo día de  $15,33cm^3$ ; marcando una tendencia creciente lo cual no indica una producción de biogás significativa. Las algas no tratadas con el lodo granular logran tener una acumulación de biogás ascendente hasta el día quinto con una producción de biogás de  $6,67cm^3$ , sin embargo al sexto demuestra un descenso total del biogás recuperándose en los dos días subsiguientes y llegando a obtener una producción de biogás correspondiente a  $11,67cm^3$ . El lodo granular en agua destilada tuvo sus puntos representativos de producción de biogás en el día 5 y el día 8, siendo  $9,00cm^3$  y  $9,67cm^3$  respectivamente, por último las algas en agua destilada nos permiten establecerlo como un control negativo al no generar durante el tiempo determinado ningún desplazamiento de biogás.

De los ensayos comparados resalta la eficiencia de la reacción Fenton en las microalgas con lodo granular, mostrando un incremento en el desplazamiento del gas y la concentración del mismo; esto se debe a dos causas:

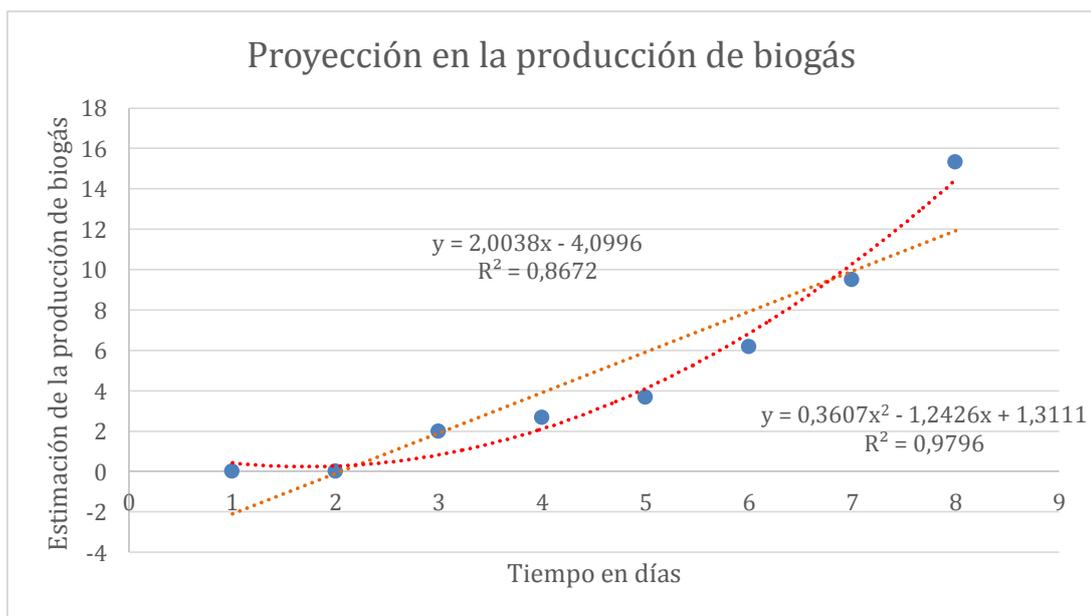
1. A la lisis celular que generan los radicales hidroxilo.
2. A que la reacción genera baja en la viabilidad en las microalgas permitiendo una más rápida degradación por parte de la acción anaeróbica generada por los microorganismos presentes en el lodo granular. Cabe resaltar que los descensos totales de dos de los ensayos se asociaron a variables no cuantificadas siendo posibles objetos de revisión a futuro (como pueden ser fugas en los recipientes; falla en el cierre hermético, consumo de los productos orgánicos).

Tiempo en días	Tendencia Lineal	Tendencia polinómica
1	0	0
2	0	0
3	2	2
4	2,67	2,67
5	3,67	3,67
6	6,17	6,17
7	9,5	9,5
8	15,33	15,33
9	13,93	21,34
10	15,93	26,95
11	17,94	33,28
12	19,94	40,34

**Tabla 12.** Proyección en la producción de biogás comparando la tendencia lineal respecto a la tendencia polinómica. Elaborado por Parada Karen

Como se demuestra en la tabla 12 se realizan dos proyecciones (Tendencia lineal y tendencia polinómica) para el ensayo de las microalgas tratadas con Fenton mas lodo granular. Con los siguientes resultados se puede apreciar que la tendencia lineal mantendrá un crecimiento en aumento constante por lo que nos permite tener un pronóstico seguro

para el día 9, 10 11 y 12 y una predicción cercana a los datos reales; los datos enunciados son los siguientes  $13,93\text{cm}^3$ ;  $15,93\text{cm}^3$ ;  $17,95\text{cm}^3$  y  $19,94\text{cm}^3$  respectivamente . Por otro lado la tendencia polinómica nos arroja valores con un crecimiento mayor, siendo un poco arriesgado puesto que podría presentarse mayor variabilidad en la producción del biogás y alterar la previsión de la producción de biogás por lo que su aplicación no es recomendable en este ensayo. Se establece que la proyección fue evaluada únicamente para el ensayo de las algas tratadas con Fenton y lodo granular principalmente a que la producción de biogás se mantuvo en de forma lineal con una continuidad predecible caso contrario a los otros ensayos.



**Figura 21.** Proyección del Ensayo microalgas tratadas con Fenton mas lodo granular. Elaborado por Parada Karen.

En la Figura 21 se evidencia que la tendencia con mejor pronóstico en producción de biogás en los días 9, 10, 11 y 12 es la tendencia lineal (0,8672) debido a que presenta unos valores concordantes en aumento; mientras que la tendencia polinómica a pesar de presentar una tendencia de 0,9796 la predicción representa un riesgo en cuanto a la producción de biogás, debido a que en un punto de la gráfica su estimación será tan alta que en términos experimentales es imposible llegar a tal producción de biogás, bajo los criterios de la tendencia polinómica.

ENSAYO	PRODUCCION DE BIOGAS (cm <sup>3</sup> )	% PRODUCCION DE BIOGAS
Algas tratadas con Fenton mas lodo granular	15,33	76,65
Algas sin tratar más lodo granular	11,67	58,35
Lodo granular más agua destilada	9,67	48,35
Algas sin tratar más agua destilada	0	0

**Tabla 13.** Distribución porcentual de producción de biogás del punto estadísticamente representativo. Elaborado por Parada Karen.

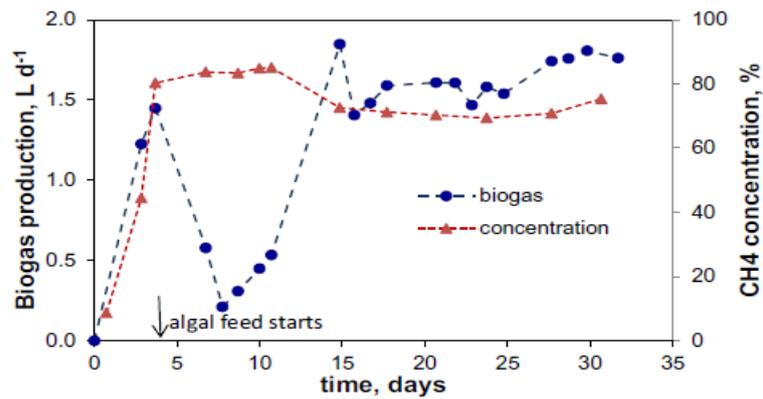
En la tabla 13, se obtiene los porcentajes de producción de biogás más representativos de la última semana evaluada con los diferentes ensayos. Determinando que el ensayo con mayor producción de biogás fue el de Algas tratadas con Fenton mas lodo granular debido a que genero un 76,65% con respecto a los otros 3 ensayos evaluados. El ensayo que pudo tener un porcentaje seguido del ensayo prometedor corresponde a las algas sin tratar más lodo granular correspondiente a un 58,35%; seguido del ensayo lodo granular más agua destilada y algas sin tratar más agua destilada con porcentajes de 48,35% y 0% respectivamente

## 5. DISCUSIÓN

La biomasa de microalgas, se presenta como prometedora fuente de materia prima para la producción de biocombustibles emergentes de tercera generación; debido a su fácil cultivo y a su prolífico crecimiento en ambientes con bajas cantidades de nutrientes, sus múltiples compuestos orgánicos generan expectativas para la obtención de biodiesel y biogás. La utilización de la biomasa como fuente sostenible para la producción de energía, representa una alternativa para la sustitución, al menos en parte, del consumo de combustibles fósiles.

Es por ello, que la prioridad de la investigación, fue evaluar la transformación de la biomasa algal en productos energéticos tales como biogás, partiendo del pre-tratamiento Fenton para después ser concentrada mediante la digestión anaeróbica producida en los biorreactores tipo UASB. Esto es demostrable partiendo de los datos obtenidos en la Figura 20, donde se describe un crecimiento proporcional ascendente para el ensayo de microalgas con pre-tratamiento Fenton y lodo granular que corresponde a 76,65% de producción de biogás; este incremento pudo ser garantizado por la lisis de la membrana celular otorgado por el pretratamiento Fenton y a la simbiosis anaeróbica propia del lodo granular; las diferentes concentraciones de biogás fueron evaluadas durante dos semanas. Este suceso es conocido en la literatura como un “proceso de secuestro de biogás” que garantiza la producción eficiente de una fuente de energía renovable. (50)

Los ensayos anteriores relacionados con la producción de metano a partir de diferentes cepas de microalgas realizadas por otros autores empleando reactores de tanque agitado continuo (CSTRs); demostraron que la producción de metano tuvo una eficiencia de generación del 40 al 50% con un tiempo de retención hidráulica de 15 a 30 días; y una retención más corta de 2,2 días para la prueba de biometanización en un reactor anaeróbico de flujo ascendente (UASB). Cabe destacar que este tipo de biorreactores, al igual que la reacción Fenton son usados típicamente para tratar aguas residuales, en lugar de desechos orgánicos sólidos. (50)



**Figura 22.** Producción de biogás y generación estable de metano obtenido a partir de un bioreactor tipo UASB alimentado con microalgas del genero *Scenedesmus oblicuo* (50). En la figura 22 de la investigación publicada en el año 2012, se visualiza un ensayo en el que se midió la concentración porcentual de metano a partir de la biomasa algal durante un tiempo determinado; estableciéndose una concentración entre el 70 al 80% de metano, con una producción de biogás superior al 80%.

Estos resultados son comparables a los obtenidos en la presente investigación (figura 20) en donde se determina que la producción de biogás en los ensayos de algas tratados con Fenton y lodo granular (ensayo que simula el biorreactor tipo UASB) fueron más estables y con una concentración proporcional en aumento de producción de biogás de aproximadamente 76,65% con respecto al periodo inicial.

De igual forma se realiza un análisis comparativo del desplazamiento del biogás en centímetros cúbicos de los ensayos realizados en la figura 19 en último día de evaluación, donde se destaca que el ensayo Fenton con lodo granular presenta un desplazamiento mayor de producción de biogás de  $3,67\text{cm}^3$ ;  $5,67\text{cm}^3$  y  $15,33\text{cm}^3$ , con respecto a los ensayos de algas sin tratar más lodo granular, lodo granular más agua destilada y algas sin tratar más agua destilada, respectivamente.

En el caso de la presente investigación se estableció un fotobiorreactor cerrado tipo Airlife, de burbujeo concéntrico, el cual proporcionó la acumulación de la biomasa y la concentración de la misma para luego disponerse en un biorreactor anaerobio de flujo ascendente (UASB); cuya finalidad era la producción de biogás mediante la interacción del lodo granular y la biomasa concentrada.

## 6. CONCLUSIONES

El fotobiorreactor Airlift de burbujeo concéntrico, elaborado para esta investigación, proporciona estabilidad, eficiencia en la acumulación de biomasa, alcanzando valores de densidad óptica iguales a 1. ( $475.5 \text{ células/mm}^3$ ), dicha biomasa es transferida al bioreactor tipo UASB previamente tratada con la reacción Fenton siendo evaluada mediante el método Bradford el cual nos indicó la ruptura de la pared celular y por ende la liberación de proteínas.

En los ensayos planteados para determinar la producción de biogás se demostró que el ensayo de microalgas tratadas con Fenton mas lodo granular obtuvo 76,65% de producción en biogás, con respecto al ensayo de microalgas sin tratar con lodo granular y el lodo granular en agua destiada; esto fue observado mediante el método estadístico descriptivo; este ensayo permite estandarizarlo como modelo, para el diseño de plantas a nivel industrial, que optimicen su operación con el fin de evitar variaciones en el sistema.

Es de suma importancia recalcar que para el objeto del presente estudio las algas pre-tratadas con el método Fenton genera baja en la viabilidad en las microalgas, permitiendo una más rápida degradación por parte de la acción anaeróbica generada por los microorganismos presentes en el lodo granular comparado a la biomasa no tratada la cual no produjo biogás.

Recomendaciones.

- Evaluar mecanismos alternos para la eliminación de agentes micoticos los cuales atacan y alteran la biomasa algal
- Evidenciar el empleo del Fenton bajo concentraciones aptas las cuales garanticen la ruptura de la membrana celular en microalgas incentivando la liberación de los componentes orgánicos, y evitando la degradación de los mismos
- Evaluar el consumo mínimo de requerimientos nutricionales que orienten el diseño de biorreactores, garantizando la generación de biomasa en menor tiempo posible y la reducción de los costos

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tamanna Sharma, Rakesh Singh, Anil Kant and Rajinder Singh. Lipid content in *Scenedesmus* species correlates with multiple genes of fatty acid and triacylglycerol biosynthetic pathways. *Algal Research*. 2015 September; Vol 12 págs 341-349.
2. L. Travieso Córdoba, E.P. Sánchez Hernández and P. Weiland. Final treatment for cattle manure using immobilized microalgae I. Study of the support media. *Resources, Conservation and Recycling*. 1995 May; Vol. 13 págs 167-175.
3. Bell Graham, Mc Gill and O. Arne. Size and complexity among multicellular organisms. *Biological Journal of the Linnean Society*. 1997 June; Vol 60 págs 345-363.
4. Samarpita Basu, Abhijit Sarma Roy, Alope K. Ghoshal and Kautubha Mohanty. Operational strategies for maximizing CO<sub>2</sub> utilization efficiency by the novel microalga *Scenedesmus obliquus* SA1 cultivated in lab scale photobioreactor. *Algal Research*. 2015 September; Vol 12 págs 249-257.
5. Katsumi Hosaka, Tadashi Hioki, Hiroyuki Furuue and Kazuo Tanishita. Augmentation of microalgae growth due to hydrodynamic activation. *Pergamon*. 1995 April; Vol 36 págs 6-9.
6. Mireya González Reyes. Alternativas en el cultivo de microalgas. Tesis de grado. Guayaquil, Ecuador: Escuela superior politecnica del litoral, Facultad de ingeniería y ciencias del mar ; 2000. Report No.: 104158.
7. Orietta Cáceres Aravena. Aislamiento y caracterización de las principales microalgas presentes en el sistema Hidropónico del tipo de raíz flotante. Tesis de Grado. Santiago, Chile: Universidad de Chile, facultad de ciencias agronómicas; 2009. Report No.: ISBN.
8. Gloria Helena Ospina Salazar, Marisol Santos Acevedo y otros. Avances en la reproducción y mantenimiento de peces marinos ornamentales. Proyecto investigativo. Santa Marta, Colombia: Invemar, Agricultura y desarrollo rural;

2011. Report No.: ISBN: 978-958-8448-37-4.
9. E. Günerken E. D'Hondt y otros. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*. 2015 February; Vol 33 págs 243-260.
  10. Wenqi Liu, Shuai Hou y otros. Quantification of proteins using enhanced etching of Ag coated Au nanorods by the Cu<sup>2+</sup>/ bicinchoninic acid pair with improved sensitivity. *The Royal Society of Chemistry*. 2015 December; Vol I págs. 1-5.
  11. Mary J. Cuantificación de proteínas. *Synatom Research*. 2012 Febrero; Vol 115 págs 1-2.
  12. Etan Bar, Moshe Rise, Marina Vishkautsan and Shoshana Arad. Pigment and Structural Changes in *Chlorella zofingiensis* upon Light and Nitrogen Stress. *J. Plant Physiol*. 1995 January; Vol 146 págs. 527-534.
  13. Malik Khursheed A. A convenient method to maintain unicellular green algae for long times as standing liquid cultures. *Journal of Microbiological Methods*. 1995 January; Vol 22 págs 221-227.
  14. James C. Ogonna, Hirokazu Yada and Hideo Tanaka. Effect of Cell Movement by Random Mixing between the Surface and Bottom of Photobioreactors on Algal Productivity. *Journal of fermentation and bioengineering*. 1995 October; Vol 79 págs 152-157.
  15. L. Travieso Córdoba E. Sánchez Hernández. Final treatment for cattle manure using immobilized microalgae. II. Influence of the recirculation. *Resources, Conservation and Recycling*. 1995 May; Vol 13 págs 177-182.
  16. Jan Burczyk and Eckhard Loos. Cell wall-bound Enzymatic Activities in *Chlorella* and *Scenedesmus*. *J. Plant Physiol*. 1995 March; Vol 146 págs. 748-750.
  17. Han Xu, Xio Ming, Quan Wing. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*. 2006 April ; Vol 126 págs 499-507.
  18. Liang Wang, Yecong Li y otros. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient

- supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*. 2010 November; Vol 101 págs 2623-2628.
19. Jian-Ming Lv, Li-Hua Cheng, Xin-Hua Xu, Lin Zhang and Huan-Lin Chen. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*. 2010 April; Vol 101 págs 6797-6804.
  20. Zelitch Israel. Symposium: plant growth regulation. *Proc. Nat. Acad.* 1973 February; Vol 70 págs 1-6.
  21. Zelitch Israel. Photosynthesis, photorespiration, and plant productivity. First edition ed. Edition UK, editor. New haven, Connecticut INC. (London ) LTD. : Academic Press ; 1971. Vol 1 págs 1-9.
  22. Yecong Li, Yi-Feng y otros. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2011 February ; Vol 102 págs 5138-5144.
  23. Yecong Li, Wenguang Zhou y otros. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresource Technology*. 2011 September; Vol 102 págs 10861-10867.
  24. Ana P. Abreu y otros. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*. 2012 May; Vol 118 págs 61-66.
  25. Davide Frumento Alessandro Alberto Casazza, Saleh Al Arni and Attilio Converti. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in tubular photobioreactors: A lipid source for biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*. 2013 October; Vol 81 págs 120-125.
  26. Ting Cai, Stephen Y. Park and Yebo Li. Nutrient recovery from waste water streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013 December; Vol 19 págs 360-369.

27. Min-Kyu Ji; Reda A.I. Abou-Shanab y otros. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO<sub>2</sub> for nutrient removal and biomass production. *Ecological Engineering*. 2013 June; Vol 58 págs 142-148.
28. Zhangran Chen, Jingyan Zhang y otros. Influence of plaque-forming bacterium, *Rhodobacteraceae* sp. on the growth of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. 2014 July; Vol 169 págs 784-788.
29. Fang Ji, Ying Liu y otros. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. *Bioresource Technology*. 2014 March; Vol 161 págs 200-207.
30. M. Mubarak, A. Shaija and T.V.Suchithra. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research*. 2014 October; Vol 20 págs 1-7.
31. Zhangran Chen, Bangzhou Zhang, Jingyan Zhang y otros. A lytic bacterium's potential application in biofuel production through directly lysing the diatom *Phaeodactylum tricornutum* cell. *Algal Research*. 2015 August; Vol 20 págs 1-8.
32. Malorie Gélinas, Thi Thanh Ha Pham, Benjamin Boëns, Kokou Adjallé, Simon Barnabé. Residual corn crop hydrolysate and silage juice as alternative carbon sources in microalgae production. *Algal Research*. 2015 August; Vol 12 págs 33-42.
33. Alessandro Solimeno, Roger Samsó y otros. New mechanistic model to simulate microalgae growth. *Algal Research*. 2015 September; Vol 12 págs 350-358.
34. C.A. Gómez-Pérez, J. Espinosa, L.C. Montenegro Ruiz, A.J.B. van Boxtel. CFD simulation for reduced energy costs in tubular photobioreactors using wall turbulence promoters. *Algal Research*. 2015 July; Vol 12 págs 1-9.
35. A.V. Piligaev K.N. Sorokina, A.V. Bryanskaya, S.E. Pelek, N.A. Kolchanov, V.N. Parmon. Isolation of prospective microalgal strains with high saturated fatty acid content for biofuel production. *Algal Research*. 2015 August; Vol 12 págs 368-376.
36. Leidy Johanna Rendón Castrillón Margarita Enid Ramires Carmona y Yesid Vélez Salazar. *Microalgas para la industria alimenticia*. Primera edición ed. Posada JJG,

- editor. Medellin, Colombia: Universidad Pontificia Bolivariana; 2013.
37. Madigan Michael. Brock, biología de los microorganismos. Octava edición ed. T. MM, editor. Madrid, Epaña: Prentice Hall; 1998.
38. Ana María Santos, Yolanda González Arechavala y Carlos Martín Sastre. Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. Anales de mecánica y electricidad. 2014 Febrero; Vol 20 págs 1-9.
39. José Manuel Moreira Madueño, Mercedes García Padilla y otros. Atlas de microorganismos platónicos presentes e los humedales andaluces. Primera edicion ed. Ordóñez. FP, editor. Andalucía, España: Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía; 2015.
40. Helena Curtis. Curtis Biología. Septima edición ed. Adriana Schnek AM, editor. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2008.
41. Giordano Mario and John A. Raven. Algae. Current Biology. 2014 July; Vol 24 págs 1-13.
42. Guzmán Sánchez José Luis and Moreno Úbeda José Carlos. Aspectos prácticos de la producción de microalgas: objetivos y necesidades. Tesis Maestria. Almería, España: Universidad de Almeíra Escuela Politécnica superior, Departamento de lenguajes y computación; 2012. Report No.: ISSN.
43. E. Warren. Algae. Segunda Edición ed. Linda G, editor. San Francisco, Estados Unidos: Benjamin Cummings; 2009.
44. Nigel Grimsley, Bérangère Péquin, Charles Bachy, Hervé Moreau and Gwenel Piganeau. Cryptic Sex in the Smallest Eukaryotic Marine Green Alga. MEB. 2012 November; Vol 27 págs 47-54.
45. Jin Zhang and Huan Wang. Study on mechanism of algal inactivation and pollution. Water Science & Technology. 2015 July; Vol 73 págs 1-13.
46. M.A. Fernández de Dios, O. Iglesias, E. Bocos, M. Pazos and M.A. Sanromán. Application of benthonic microbial fuel cells and electro-Fenton process to dye

- decolourisation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2014 January; Vol 20 págs 1-7.
47. Grobbelaar Johan U. Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology*. 2000 October; Vol 21 págs 201-206.
48. Asterio Sánchez Mirón, M. Camen Cerón Garcia y otros. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal*. 2003 February; Vol 16 págs 287-297.
49. González R.A. Principios de Ingeniería de los Bioprocesos. In *Introducción a los Bioprocesos*; 2014; Lima. Vol 3 Págs. 20-49.
50. Ana P. Abreu, Bruno Fernandes, António A. Vicente, José Teixeira and Giuliano Dragone. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*. 2012 May; Vol 117 págs 61-66.

## ANEXOS

### **Anexo 1. Preparación de medio algae alga y antibiótico**

Inicialmente se realiza la siembra en medio algae agar, el cual requiere para su preparación suspender 17 gr por cada litro de agua destilada, se debe esterilizar y una vez auto clavado se dispone sobre las cajas de Petri teniendo en cuenta un volumen de 30 ml de agar. Antes de servir el agar en las cajas Petri o mientras se mide el volumen ideal de 30ml de agar, añadir 30ul de cloranfenicol (CM).

Para la preparación del antibiótico (cloranfenicol); pesar 1.5gr de CM y disolver en 10 ml de etanol. Llevar a vortex hasta que la solución se encuentre diluida

### **Anexo 2. Preparación de albumina sérica bovina (BCA)**

Tomar y pesar 100mg de BCA y aforar con agua destilada en un balón aforado de 100ml, a partir de esta solución realizar las siguientes diluciones.

<b>Solución mg/L</b>	<b>Solución madre concentración <math>\mu</math>l</b>
10	250
20	500
50	1250
100	2500
200	5000

**Tabla 14.** Curva de calibración para lectura de proteínas por el método Bradford

Para las diluciones provenientes de la solución madre es necesario emplear balones aforados de 25ml encada una de las concentraciones correspondientes a la tabla 12. (Solución mg/L)

### **Anexo 3. Preparación del reactivo Bradford empleado en la cuantificación de proteínas.**

Esta preparación es para un volumen final de 100ml. Prepararlo del siguiente modo:

1. Mezclar 10mg del reactivo Comassie Blue G-250 en 10ml de ácido fosfórico al 88%
2. Agregar 4,7ml de etanol absoluto
3. Añadir agua destilada en un balón aforado y llevar hasta 100ml
4. Mezclar la solución procurando la homogenización de la misma
5. Filtrar a través de papel filtro de 25 $\mu$ m
6. Guardar en recipiente ámbar en la oscuridad

### **Anexo 4. Determinación de peso en seco**

La determinación de peso en seco se realizó después de que se calculara un volumen de algas correspondiente a 150ml, igualmente fue evaluada por espectrofotometría a una OD (densidad óptica) igual a 1. El volumen de 150ml de algas fue centrifugada durante 15 minutos a 450 r.p.m, cabe resaltar que este volumen fue distribuido en 3 falcon cada uno de 50ml y se descartó su sobrenadante.

Para determinar el peso seco se requirió emplear un horno secador en el cual se dejaron desecar 3 capsulas de porcelanas durante 24 horas para asegurar que la humedad contenida en las mismas se evaporara. Posterior al tiempo se traspasó el pellet de cada uno de los falcon en las capsulas de porcelanas resuspendiendo el pellet en 1.0 ml de agua destilada sobre las capsulas. Las capsulas se dejaron desecar para poder tararlas y determinar el peso en seco.

#### **Anexo 5. Estandarización del método Fenton como pre-tratamiento en microalgas (*Chlorella sp*)**

1. Tomar 5 falcon de 10 ml y rectificar que la densidad óptica correspondiente a 1 OD.
2. Centrifugar los 5 falcon a 4500 r.p.m durante 15 minutos.
3. Descartar el sobrenadante.
4. Realizar Fenton a 3 falcon de 10ml previamente ya centrifugados, añadir 280µl de  $FeSO_4$  (Sulfato Férrico).Se debe procurar que el pellet se resuspenda totalmente en el sulfato de hierro (II)
5. Posterior a ello añadir a cada falcon 20µl de  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogeno) dejándolo reaccionar durante 6 minutos
6. Al cabo del tiempo adicionar 40µl  $NaHSO_3$  (bisulfito de sodio) para frenar la reacción y evitar la degradación de los compuestos orgánicos
7. Al cuarto falcon se tomará como control positivo con sornicador, siendo un método electromecánico
8. Al quinto falcon se tomará como control negativo al ser diluido 340 µl de agua destilada
9. Hacer lectura en espectrofotometría por el método Bradford. Para esta prueba tener en cuenta que se debe tomar 200 µl de muestra y 2 ml del reactivo Bradford. Lectura realizada a 595nm.

Muestras	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio de Abs
Fenton 1	0.078	0.054	0.089	0.073
Fenton 2	0.066	0.056	0.074	0.065
Fenton 3	0.073	0.052	0.070	0.065
Ultrasonido	0.229	0,215	0.297	0.247
C. negativo	0.017	0.019	0.022	0.019
BCA 1250 µl	0.185	0.183	0.189	0.185
BCA 5000 µl	0.701	0.699	0.716	0.705

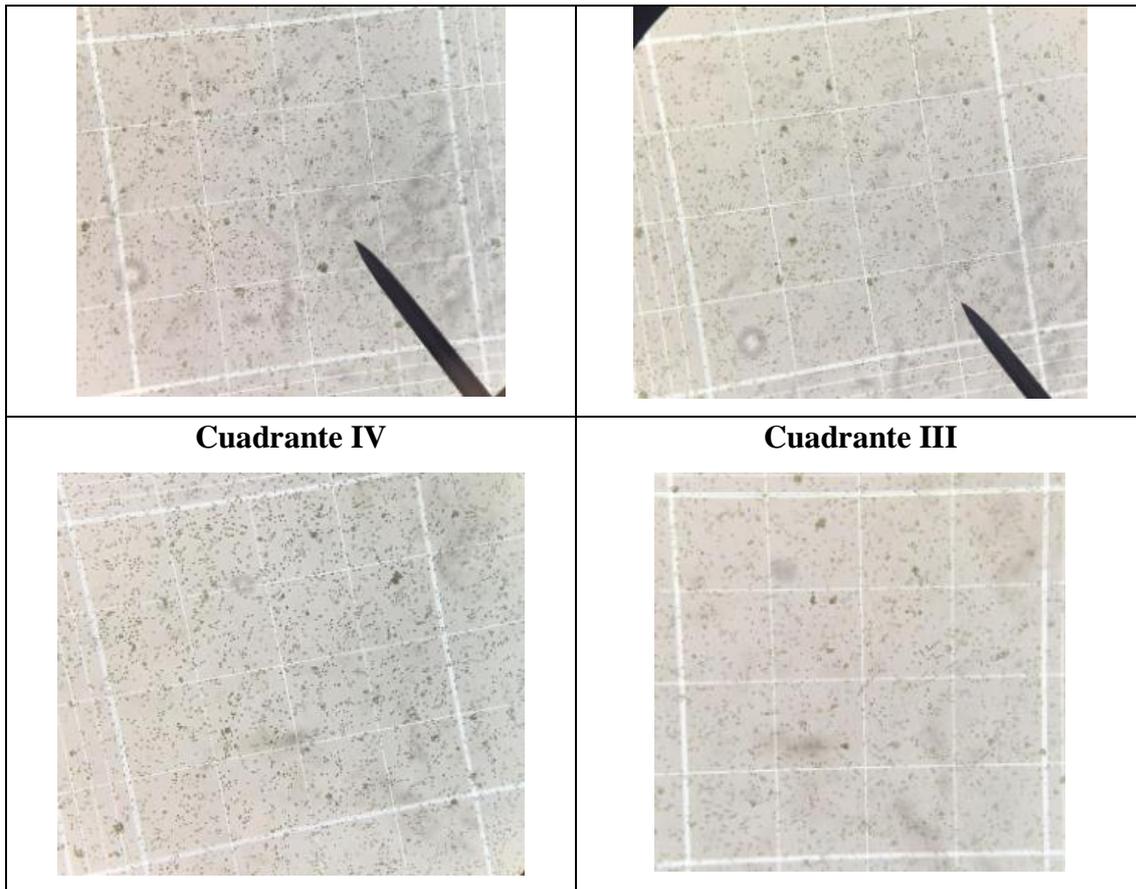
**Tabla 15.** Resultados de los ensayos para la cuantificación de proteínas mediante el empleo del método Bradford a una absorbancia de 595nm.

#### Anexo 6. Resultado de cada una de las diluciones por cuadrante

##### Muestra pura sin dilución

I				II			
152	194	154	156	136	217	126	161
149	141	145	123	150	100	160	132
108	184	172	166	200	177	153	142
129	167	135	164	129	141	109	135
IV				III			
139	114	113	135	166	200	197	120
124	158	201	143	152	128	141	159
127	140	154	162	113	127	182	133
137	127	173	223	114	127	145	127

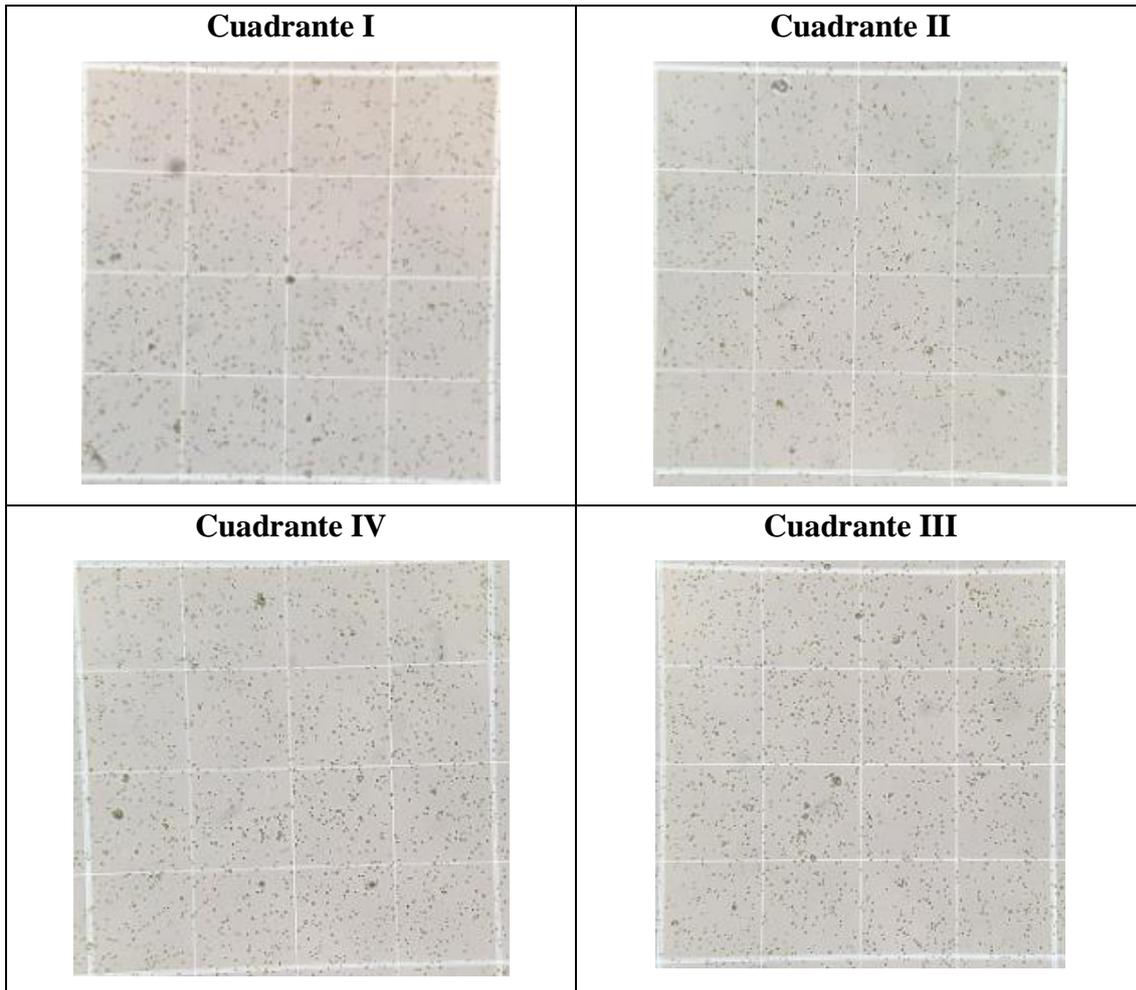
<b>Cuadrante I</b>	<b>Cuadrante II</b>
--------------------	---------------------



**Figura 23.** Cuadrantes del conteo celular de microalgas (*Chlorella sp.*) en la muestra pura sin diluir

**Dilución 1/33**

I				II			
80	90	117	76	97	104	114	100
88	93	77	94	76	104	120	89
104	74	101	94	86	96	100	106
106	114	86	93	83	89	105	115
IV				III			
85	103	108	110	97	72	128	81
66	89	112	75	89	95	68	83
80	111	93	116	108	88	81	101
85	100	114	111	98	120	95	108



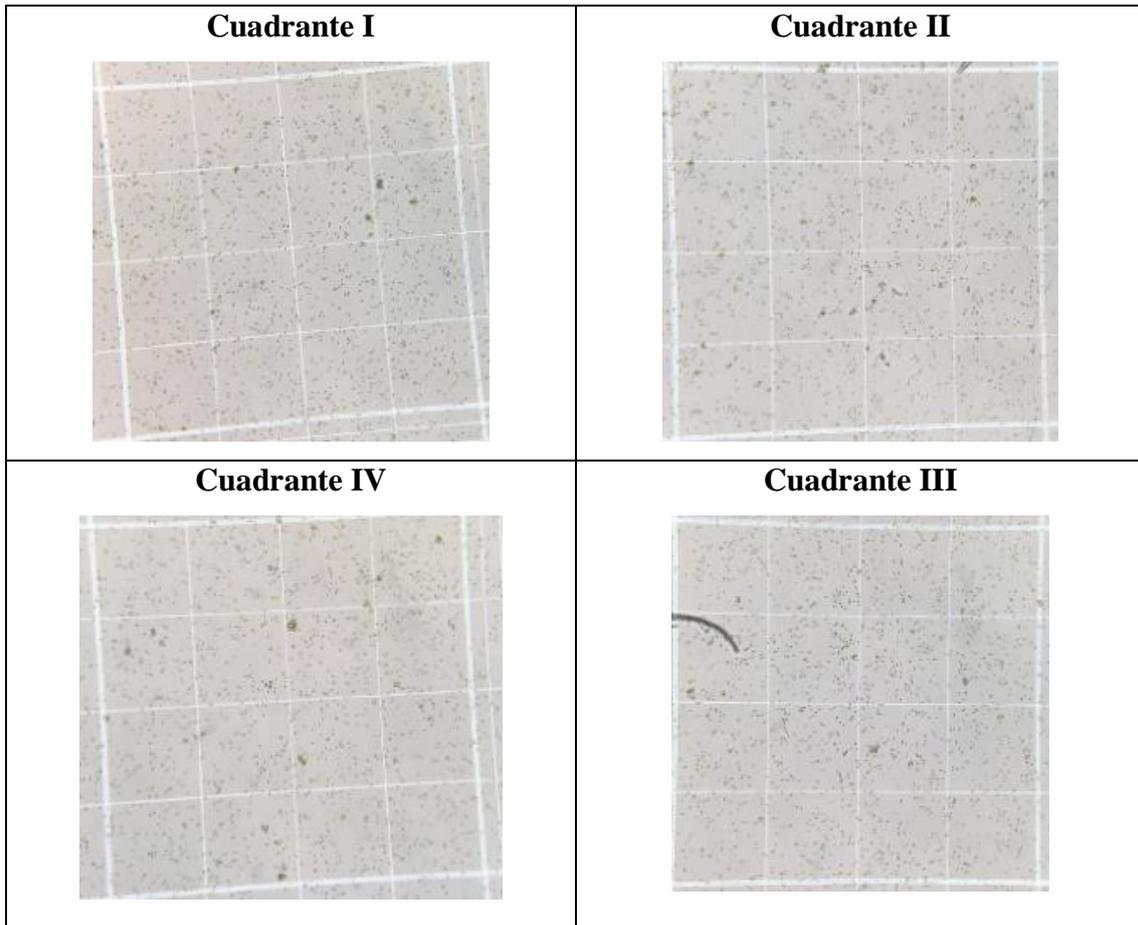
**Figura 24.** Cuadrantes del conteo celular de microalgas (*Chlorella sp*) en la muestra con dilución 1/33

**Dilución 1/5**

I				II			
106	116	101	106	107	93	82	77
95	92	87	78	72	76	98	88
74	101	99	94	96	97	87	85
87	45	123	98	69	101	79	80

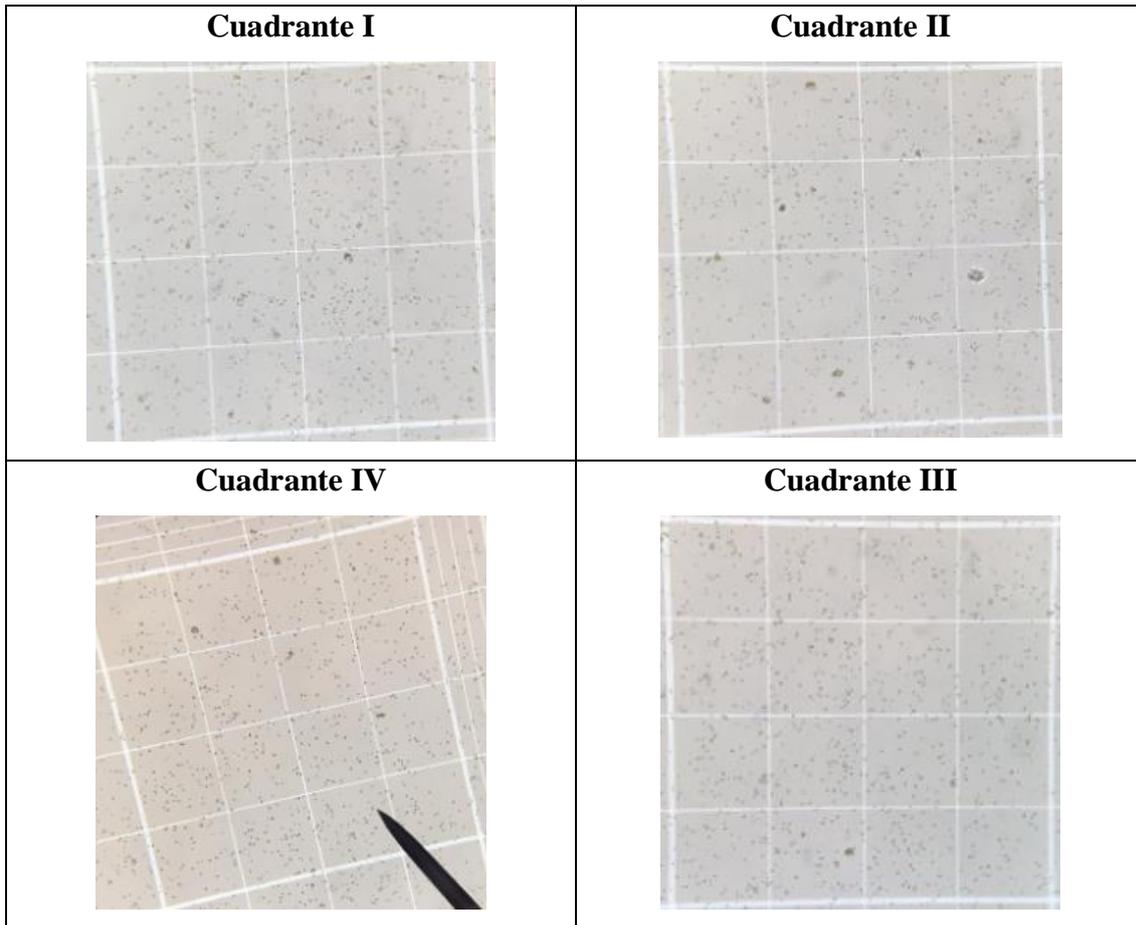
IV				III			
107	97	94	81	78	104	88	93
65	69	91	95	87	86	73	61
84	99	91	79	77	99	105	104
71	92	87	87	75	103	92	84



**Figura 25.** Cuadrantes del conteo celular de microalgas (*Chlorella sp*) en la muestra con dilución 1/5

**Dilución 1/2**

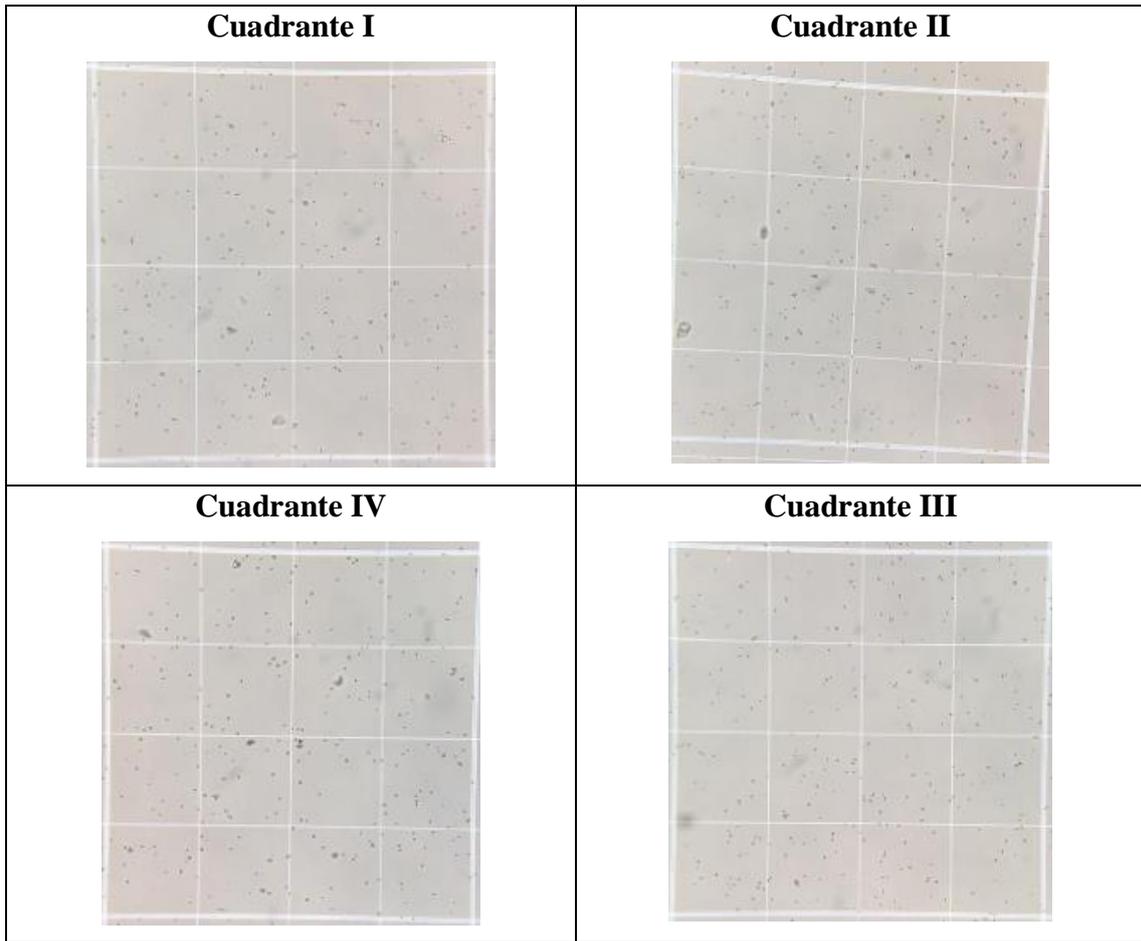
I				II			
62	88	76	54	70	58	51	55
67	86	85	79	51	71	64	65
69	70	56	76	67	63	64	58
85	68	69	55	62	52	57	46
IV				III			
54	75	68	69	90	88	67	59
60	60	50	71	70	99	61	66
79	65	56	63	62	54	78	94
64	79	70	61	71	85	76	97



**Figura 26.** Cuadrantes del conteo celular de microalgas (*Chlorella sp*) en la muestra con dilución 1/2

**Dilución 1/10**

I				II			
14	12	8	17	13	13	18	29
16	26	15	14	19	24	29	13
11	12	20	14	30	13	22	32
16	15	9	11	17	18	15	19
IV				III			
6	5	6	16	6	11	4	17
12	14	19	10	18	21	7	21
12	18	24	14	9	17	27	11
18	8	12	17	15	16	17	12



**Figura 27.** Cuadrantes del conteo celular de microalgas (*Chlorella sp*) en la muestra con dilución 1/10