

Desarrollo y evaluación de reactores planos para la producción de biodiesel por medio de microalgas cultivadas en agua de escorrentía

Helena María Gallo Peña

Maestría en Ingeniería Ambiental, Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Johana Husserl Orjuela - Asesora

Profesora Asistente, Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Juan Pablo Rodríguez Sánchez – Jurado Interno

Profesor Asistente, Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Andrés González Barrios – Jurado Externo

Profesor Asociado, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

Abstract

Biodiesel made from microalgae has emerged as a source of renewable energy and a potential alternative to fossil fuels. Much effort, therefore, has been made to find solutions to the techno-economical bottlenecks that have limited its feasibility. One option to reduce production costs is to test different types of water in the culture. Thus, the present study used synthetic water, rainwater and green roof runoff to grow *Chlamydomonas* sp. to produce biodiesel. The tests were performed in the laboratory, in flasks and using a flat reactor designed specifically for this investigation, without stirring and control of temperature, light and CO₂. Depending on the type of water, differences were found in growth kinetics, biomass and lipid productivities, and fatty acid compositions. In the flasks, the filtered green roof runoff (MTVf) exhibited the highest biomass and lipid productivities, $0,3716 \pm 0,054$ g/L/d y $0,078 \pm 0,013$ g/L/d, respectively. On the other hand, the unfiltered green roof runoff (MTVsf) presented palmitic acid C16: 0, palmitoleic acid C16: 1 and linolenic acid C18: 3, which are necessary in good quality biodiesel. In the reactors, *Chlamydomonas* sp. growth in synthetic water (RRSm) and filtered green roof runoff (RTV), and generated lipid productivities similar to those in flasks. The flat reactor proved valuable for analyzing these results and its applicability to urban environments seems possible.

Resumen

El biodiesel a partir de microalgas ha surgido como una fuente de energía renovable y una alternativa potencial a los carburantes fósiles. Por tal motivo, son numerosos los esfuerzos por encontrar soluciones a los cuellos de botella que limitan su viabilidad tecnoeconómica. Una opción para reducir los costos, ha sido la utilización de diferentes tipos de agua como medio de cultivo. Es así, como en este trabajo se propuso el uso de agua lluvia y agua de techos verdes para la producción de biodiesel. Con la finalidad de evaluar dicha propuesta, agua lluvia, agua proveniente de techos verdes y agua sintética fueron utilizadas como medios para cultivar *Chlamydomonas* sp. Las pruebas se realizaron a nivel de laboratorio, en reactores tipo plano diseñados en el presente estudio y en matraces, en ausencia de agitación y sin control de temperatura, luz y CO₂. Según el tipo de agua utilizado, se encontraron diferencias en la cinética de crecimiento, en las productividades de la biomasa, de los lípidos totales, y en la composición de los ácidos grasos. En los matraces, el sistema que empleó agua de techos verdes filtrada (MTVf) exhibió las mayores productividades de biomasa y de lípidos totales, $0,3716 \pm 0,054$ g/L/d y $0,078 \pm 0,013$ g/L/d, respectivamente. Por su parte, el cultivo con agua de techos verdes sin filtrar (MTVsf) presentó los ácidos palmítico C16:0, palmitoléico C16:1 y linolénico C18:3, los cuales son reconocidos como indispensables en biodiesel de buena calidad. Bajo las condiciones de operación del estudio, *Chlamydomonas* sp. exhibió crecimiento y presencia de lípidos totales en los reactores con agua sintética (RRSm) y agua de techos verdes filtrada (RTV).

Palabras claves: *Chlamydomonas* sp., reactor plano, agua sintética, agua lluvia, agua techos verdes, FAME.

Introducción

Las sociedades actuales enfrentan a nivel energético tanto la disminución de las reservas de combustibles fósiles, como el deterioro ambiental asociado a la emisión de gases

de efecto invernadero. Estas problemáticas han motivado la transición a combustibles derivados de recursos naturales renovables, como mecanismo para garantizar la disponibilidad de carburantes y reducir o mitigar las emisiones de CO₂ (Hu *et al.*, 2014; Aguirre, Bassi &

Saxena, 2013; Valenzuela *et al.*, 2013; CEPAL, 2011a). En consecuencia, la investigación de la producción de biocombustibles es permanente y la industria asociada toma cada vez más relevancia (Vidyashankar *et al.*, 2015; Vaiciulyté *et al.*, 2014; Mahapatra & Ramachandra, 2013; CEPAL, 2011b). Convencionalmente, las fuentes de materias primas para la producción de biocombustible son el girasol, el maíz, la caña de azúcar, la colza, la soya, el coco, la palma y la jatrofa, las cuales son obtenidas a través de actividades agrícolas (Hu *et al.*, 2014; Chen & Wu, 2011; CEPAL, 2009). No obstante, dichas labores provocan preocupación por sus efectos negativos en la tierra, el agua y la biodiversidad, debido al cambio en el uso de la tierra y por su intensificación; por la escasez del agua y su contaminación, y por la alteración del hábitat y su consecuente pérdida de biodiversidad (Woods & Kalas, 2014; Chen & Wu, 2011; FAO, 2003). Por esta razón, surge la alternativa de cultivar algas para no competir con el suministro de alimentos y reducir la presión sobre las tierras cultivables (Sun *et al.*, 2015; FAO, 2014a; Hu *et al.*, 2014). Sin embargo, este proceso tiene sus propios desafíos, limitaciones y exigencias, y los aspectos más vulnerables son su sostenibilidad, eficiencia y rentabilidad (Hochman & Zilberman, 2014; FAO, 2014b, Aguirre, Bassi & Saxena, 2013; Chen & Wu, 2011). En respuesta a los efectos adversos que generan los combustibles fósiles, se adelantan diversas iniciativas como el cultivo de microalgas para el desarrollo de biocarburantes más amigables con el medio ambiente y que a su vez sean viables técnica y económicamente.

Las algas son organismos muy versátiles que pueden crecer en ambientes muy variados y son altamente productivas a escala global. Las microalgas representan tan solo el 0,2% de la biomasa global generada a través de la fotosíntesis, pero son responsables del 50% del CO₂ total fijado (Field *et al.*, 1998). Parte de la naturaleza adaptable de estos organismos se manifiesta en la capacidad de crecer de

manera autótrofa, heterótrofa y mixotrófica (Leite *et al.*, 2015; Taberero, Martín del Valle & Galán, 2012; Pérez-García, *et al.*, 2011 y Liang, Sarkany & Cui, 2009). Gracias a su fisiología y estructura, las microalgas presentan mayor eficiencia fotosintética en comparación con las plantas terrestres (Farooq *et al.*, 2015; Vidyashankar *et al.*, 2015; Weyer *et al.*, 2010 y Pruvost, Borgne & Legrand, 2008), y sintetizan y acumulan grandes cantidades de lípidos neutros (Leite *et al.*, 2015; Razzak *et al.*, 2013; Huang & Su, 2014; Kliphuis *et al.*, 2012). Cuando el interés es la obtención de mayores rendimientos en la producción de bioaceites, se cultivan algas verdes o Clorofíceas, debido a su ubicuidad, rápido crecimiento y respuesta al estrés abiótico, situación que genera un incremento en el contenido lipídico, muy superior al presentado por otras taxas (Vidyashankar *et al.*, 2015).

En ese sentido, el género *Chlamydomonas* sp. es un excelente representante de dicha versatilidad y es considerado un sistema modelo porque ofrece un ciclo de vida sencillo, facilidad para aislar mutantes y una creciente variedad de técnicas y herramientas para estudios metabólicos y de genética molecular (Harris, 2001). Entre las principales áreas de investigación que utilizan este sistema modelo se encuentran, estructura y función flagelar, genética de los cuerpos basales, biogénesis del cloroplasto, fotosíntesis, efecto de la luz, reconocimiento célula-célula, control del ciclo celular (Harris, 2001), rutas metabólicas, proteínas recombinantes, plásmidos, genoma, ingeniería genética (Park *et al.*, 2015; Rasala *et al.*, 2014; Remacle *et al.*, 2014; Kliphuis *et al.*, 2012 y Chen & Wu, 2011) y producción de biocombustibles (Scranton *et al.*, 2015). Es así, como este organismo es muy útil para entender y mejorar la producción de biocarburantes y bioproductos, debido a que ha sido el más estudiado y los procedimientos empleados en esta microalga pueden ser aplicados y validados en otros organismos (Scranton *et al.*, 2015). Adicionalmente, este género es reportado como un

buen candidato para producir biodiesel en términos de biomasa, porcentaje lipídico (Abdelaziz, 2014; Remacle *et al.*, 2014 y Kliphuis *et al.*, 2012) y calidad y composición de los ácidos grasos, con presencia de ácidos saturados C16 e insaturados C18 (Zhang *et al.*, 2014). En cuanto a la morfología de esta microalga, es un alga verde, unicelular, con dos flagelos apicales y un gran cloroplasto basal; la cual puede disponerse individualmente o agregada en estado palmeloide (Harris, 1989).

A groso modo, las microalgas son tan diversas y adaptables que en buena medida, su aprovechamiento se limita a seleccionar el alga correcta para una aplicación específica. Con respecto a la producción de biodiesel, el énfasis es el cultivo de organismos eficientes fotosintéticamente, con altos rendimientos en biomasa y en aceites.

En términos generales, el cultivo de microalgas para la producción de aceites se realiza en sistemas abiertos y cerrados. Los sistemas abiertos incluyen estanques descubiertos y semicerrados, y los cerrados comprenden fotoreactores tubulares, planos, tipo membrana, bolsa plástica, biopelícula e híbrido (Razzak *et al.*, 2013; Singh & Sharma, 2012). En ambos casos, se debe considerar la disponibilidad de luz, agua, nutrientes, y las condiciones de temperatura y de pH para un crecimiento adecuado (Abdelaziz, 2014 y Wang, Lan & Horsman, 2012). Los sistemas abiertos tienen menores costos pero sus principales desventajas radican en la alta susceptibilidad de contaminación, las grandes extensiones de tierra requeridas y el escaso control de las variables de cultivo (Rajkumar, Yaakob & Takriff, 2014 y Savage & Hestekin, 2013).

Por otro lado, los bioreactores facilitan el control de la operación y pueden reducir el área demandada, sin embargo, el sobrecalentamiento, el ensuciamiento y los costos elevados son sus principales dificultades (Ación; Fernández & Molina, 2013; Singh & Sharma, 2012; Wang, Lang & Horsman, 2012).

En virtud de potencializar los beneficios y contrarrestar las deficiencias de estos métodos, en los últimos años se han promovido los sistemas integrados que emplean diferentes tipos de agua como medio de cultivo y generan diversos coproductos, con el fin de reducir costos y facilitar la factibilidad (Eustance *et al.*, 2015; Abdelaziz *et al.*, 2014; Zhang, Wu & Hu, 2014; Mahapatra & Ramachandra, 2013; CATF, 2013). Las alternativas para cultivar microalgas son variadas y seleccionar el método correcto es el primer paso para acercarse a la sostenibilidad del proceso.

Al respecto, las fuentes de nutrientes, los tipos de sustratos disponibles y sus concentraciones son un tema de principal interés durante el cultivo, con el fin de obtener las mayores productividades. Independiente de los diversos niveles de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) que se pueden establecer en un cultivo, el carbono (C) es indispensable para los procesos de biosíntesis de biomasa y de lípidos. Las múltiples respuestas celulares a los niveles de C, N y P se pueden explicar a partir de los radios de estos nutrientes (Fields *et al.*, 2014). Un radio comúnmente aceptado en microalgas es el Redfield, C106:N16:P1 (Valenzuela *et al.*, 2013), el cual es una relación estequiométrica desarrollada empíricamente para el fitoplancton marino y define la composición del organismo y la química del agua (Geider & La Roche, 2002). Sin embargo, el radio Redfield (6,6) no es permanente y las variaciones están dadas por la especie, la fase de crecimiento, la fuente de C, la disponibilidad de luz, entre otros factores (Pérez-Morales *et al.*, 2015). En consecuencia, algunos autores han reportado radios entre 4 y 35 (Pérez-Morales *et al.*, 2015; Geider & La Roche, 2002; Fábregas *et al.*, 1995 & Corzo & Niell, 1991), lo que indica las múltiples proporciones que los macronutrientes pueden presentar a lo largo de un cultivo.

En cuanto a la acumulación de lípidos, ésta se puede estimular a partir de condiciones de estrés celular, siendo la limitación de nutrientes una de las más estudiadas. La

respuesta fisiológica a la limitación de P es diferente a la de N debido a los diversos requerimientos y rutas para la ubicación de los recursos (proteínas vs nucleótidos) (Muthuraj *et al.*, 2014). Ambos resultan en un crecimiento más lento o en la cesación del ciclo celular, pero la respuesta en la acumulación de lípidos es diferente (Remacle *et al.*, 2014). La demanda de N ejerce un efecto mayor en la ubicación de los recursos debido al radio Redfield y por lo tanto, el metabolismo del C y el N están inherentemente ligados vía metabolitos (Valenzuela *et al.*, 2013). Asimismo, las células requieren más C para la producción de biomasa que para la acumulación de lípidos. Cuando no hay N disponible, la producción de proteínas es limitada, pero la fijación de C continúa y puede ser dirigida a moléculas de almacenamiento de energía, como los lípidos (Valenzuela *et al.*, 2013). A partir de lo anterior, es evidente la importancia de conocer las respuestas celulares y poblaciones a las concentraciones y a los radios de los macronutrientes (C, N y P), para promover la utilización más eficiente de los recursos intracelulares y generar procesos más costo efectivos en la producción de biomasa y de lípidos.

A pesar de las posibilidades que representan las microalgas para la industria de los combustibles renovables, la cadena de producción debe superar los costos elevados actuales o de lo contrario, no podrá ser considerada como una alternativa sostenible. Los cuellos de botella que exhibe la producción de biodiesel se presentan en el cultivo y la cosecha de las microalgas, en la extracción y la conversión de los aceites y en el escalamiento (Lee *et al.*, 2014; Kandilian, Tsao & Pilon, 2014; Aguirre, Bassi & Saxena, 2013; Wawrik & Harriman, 2010). Por tal motivo, son innumerables los esfuerzos por incorporar mejoras tanto en los procesos como en las tecnologías empleadas, para lograr mayor eficacia y viabilizar la producción (Muthuraj *et al.*, 2014; Giovanardi *et al.*, 2014 y Rosenberg *et al.*, 2014).

Una de las opciones implementadas ha sido el tratamiento biológico de aguas residuales a través de microalgas, proceso que acopla diversas ventajas como la remoción de nutrientes en el efluente, la producción de biomasa microalgal, la disminución del agua potable utilizada en el cultivo y la reducción o eliminación de los costos por adquisición de fertilizantes (Renuka *et al.*, 2015; Abdelaziz *et al.*, 2014 y Zhang *et al.*, 2014).

Algunos medios alternativos para el cultivo de microalgas, que podrían presentar ventajas adicionales a las generadas con las aguas residuales, son el agua lluvia y el agua de techos verdes. En el caso de algunas regiones, la escorrentía puede ser un gran problema en épocas de lluvia, al ocasionar erosión, inundaciones severas y/o al contaminarse con aguas residuales (Guerrero & Gámez, 2014; Álvarez, 2013 y Oviedo, 2012). En la actualidad, una estrategia de manejo de este tipo de agua, es su utilización como fuente de irrigación para techos verdes. Dentro de los múltiples beneficios atribuidos a estas estructuras, se destaca la capacidad de absorción del agua lluvia (MSU, 2015; Carter & Butler, 2008; Oberndorfer *et al.*, 2007; Getter & Rowe, 2006). No obstante, una porción de esa agua es liberada posteriormente y en esa medida, ese nuevo efluente podría emplearse en el cultivo de microalgas. Así las cosas, algunos beneficios adicionales con dichos tipos de agua serían el manejo de la escorrentía, la reducción del efecto de isla de calor y la inclusión de elementos paisajísticos (USGBC, 2009).

Permanentemente, se evalúan opciones para hacer factible el biodiesel derivado de las microalgas, iniciativas que abarcan todas las etapas de producción. En ciertas ciudades como Bogotá, el agua lluvia y el agua de techos verdes podrían ser una opción potencial novedosa para este cultivo, lo que fomentaría un sistema integrado nuevo, con efectos positivos acumulativos y la incorporación de prácticas más sostenibles en los espacios urbanos. Por lo tanto, en el presente trabajo se plantearon las siguientes

preguntas de investigación: ¿Cómo influye el tipo de agua utilizado en el crecimiento microalgal y en la producción de aceites? ¿Es posible utilizar un reactor tipo plano para cultivar microalgas y generar bioaceites, que a futuro pueda ser instalado en fachadas? Para dar respuesta a estas preguntas se experimentó a escala de laboratorio tanto en

matraces como en reactores, para evaluar la producción de biodiesel a partir de microalgas, empleando diferentes tipos de agua. La cinética de crecimiento se evaluó a través de cultivos en matraces utilizando agua sintética, agua lluvia y agua de techos verdes, y la producción de aceites se valoró en ambos sistemas de cultivo.

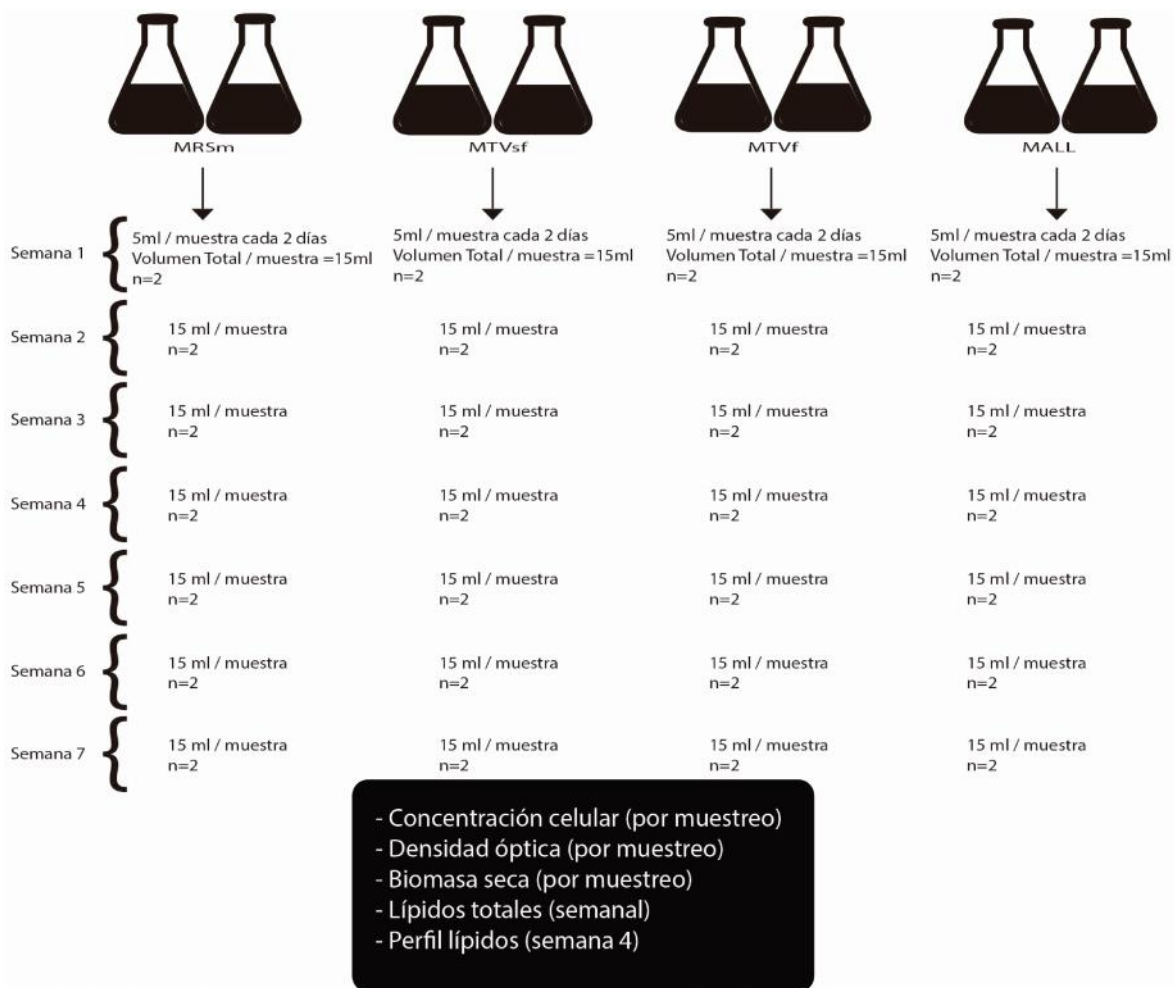


Figura 1. Esquema del muestreo realizado durante siete semanas en MRSm, MTVsf, MTVf y MALL. Frecuencia de los muestreos, volúmenes empleados, número de muestras y parámetros evaluados.

Materiales y métodos

Microalgas

Se trabajó con microalgas del género *Chlamydomonas* sp. las cuales fueron donadas por la tesista Daniela Mora, estudiante del Profesor Andrés González Barrios del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de los Andes.

Medios de Cultivo

Se utilizaron cuatro medios de cultivo, medio sintético, agua de techos verdes, agua de techos verdes filtrada y agua lluvia. La caracterización inicial de los medios mencionados se realizó según *The Standard Methods 22nd ed.* para DQO, fósforo total y nitrógeno amoniacal, siguiendo los métodos SM 5220 D, SM 4500-P, B C y SM 4500-NH3 C, respectivamente. El pH inicial se registró con

un pHmetro Thermo Scientific Orion. El seguimiento al pH durante el desarrollo de los cultivos se hizo mediante cinta medidora. Parte del agua de los techos verdes se filtró para evaluar el efecto que la turbiedad pudiera tener en el desarrollo del cultivo y en la producción de lípidos neutros.

Medio sintético

El medio RSm fue el agua sintética utilizada para la adaptación y el cultivo de las microalgas, con adición de 1ml/L de solución de trazas y ajuste a pH 7,0 antes de ser esterilizado (Cantillo, Husserl & González, 2012). La composición del medio RSm fue 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 1,216 g/L de NH_4Cl , 0,03 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,99 g/L de Na_2HPO_4 y 0,0045 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La solución de trazas consistió en 0,1 g/L de H_3BO_3 , 0,02 g/L de CaCl_2 , 0,05 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/L de $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,012 g/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,322 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0,314 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Este medio se empleó tanto en reactor (RRSm), como en matraces (MRSm).

Agua de escorrentía

El agua lluvia y el agua de los techos verdes fueron donadas por el tesista Pascual Ferrans, estudiante del Profesor Juan Pablo Rodríguez Sánchez del Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental de la Universidad de los Andes. Las muestras fueron tomadas de los montajes presentes en la terraza del Edificio de Física IP, de la Universidad de los Andes, durante los meses de agosto y septiembre del 2015.

El agua lluvia se recogió luego de fluir sobre tejas plásticas y el agua proveniente de los techos verdes se recolectó de una estructura con las siguientes dimensiones: 80 cm de ancho x 80 cm de largo x 30 cm de profundidad aproximadamente. La cubierta vegetal consolidada durante más de seis meses, estaba conformada por las siguientes especies: *Sedum blue*, *Sedum acre*, *Sedum .fino*, *Sedum sexangulare*, *Sedum chatre* y *Sedum oregano* (P. Ferrans, comunicación personal, enero 15 de 2016). Debido a un

tema de confidencialidad, no se tuvo acceso a la composición del sustrato de crecimiento de los techos verdes.

Los cultivos en los matraces se realizaron con agua lluvia (MALL), agua de techos verdes sin filtrar (MTVsf) y agua de techos verdes filtrada (MTVf). Por su parte, los reactores emplearon únicamente agua de techos verdes filtrada (RTV) y agua lluvia (RALL). En todos los casos, estos medios fueron esterilizados y el agua lluvia fue filtrada.

Cultivo en matraces

Todos los cultivos en matraces fueron realizados por duplicado y se ubicaron al interior de una ventana orientada hacia el oriente, con agitación manual durante 3 s, cinco días a la semana. La temperatura, la radiación solar y el suministro de CO_2 no fueron controlados, dependieron de las condiciones ambientales. El esquema de muestreo se detalla en la Figura 1.

Cultivo en reactores

Los fotobioreactores se construyeron en láminas de acrílico transparente reciclado, con un volumen interno aproximado de 300 ml y un ancho de 2 cm, con rampas orientadas a 20° para favorecer el desplazamiento de las algas acumuladas en cada nivel del reactor. Se empleó un sistema de microgoteo para controlar la extracción del medio (Figura 2).

Estos cultivos contaron con un solo reactor para cada tipo de sustrato y fueron ubicados al interior de una ventana, con orientación hacia el oriente y la agitación fue escasa, se presentó únicamente al momento de extraer y adicionar el medio. En este caso, la temperatura, la radiación solar y el suministro de CO_2 tampoco fueron controlados.

Inicialmente, se evaluó el comportamiento de las microalgas en RRSm, con la finalidad de confirmar crecimiento algal. Luego de corroborarlo, se fabricaron los otros reactores y se procedió a hacer el seguimiento con los demás sustratos. Para reducir el riesgo de contaminación, se alternó la limpieza de las superficies externas de los reactores con alcohol y H₂O₂, y se utilizaron jeringas estériles para adicionar los medios autoclavados. La Figura 3 presenta el sistema de muestreo y la Tabla 1, las condiciones de cultivo en los reactores.

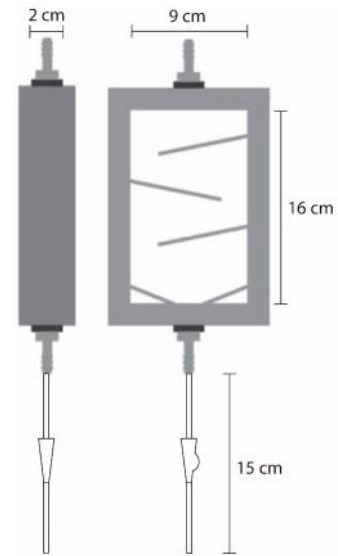


Figura 2. Fotobioreactor diseñado y evaluado durante el estudio.

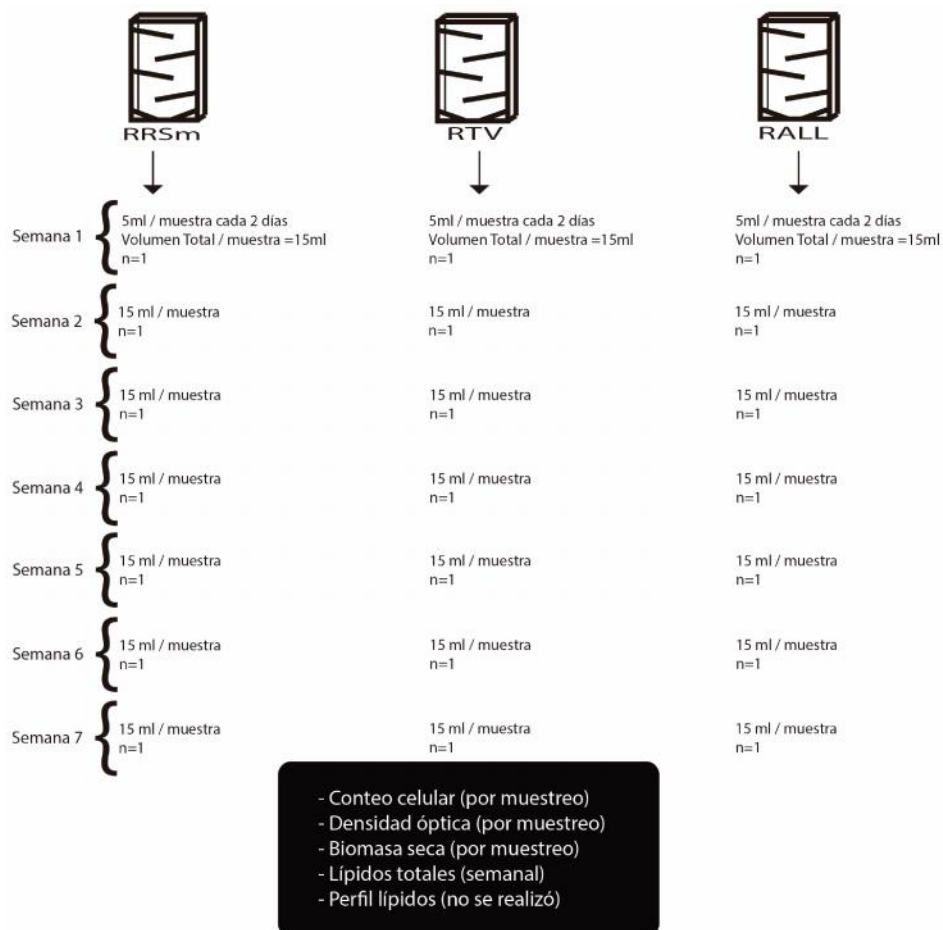


Figura 3. Esquema del muestreo realizado durante siete semanas en RRSm, RTV y RALL. Frecuencia de los muestreos, volúmenes empleados, número de muestras y parámetros evaluados.

Tabla 1. Condiciones de cultivo en los reactores RRSm, RALL y RTV.

	RRSm	RTV	RALL
Medio de cultivo	RSm	Agua de techos verdes (filtrada)	Agua lluvia (filtrada)
Volumen	300 ml	300 ml	300 ml
Inóculo	3 ml cultivo en RSm	3 ml cultivo en agua techo verde sin filtrar	3 ml cultivo en agua techo verde sin filtrar
Temperatura	ambiente	ambiente	Ambiente
Radiación solar	ambiente	ambiente	ambiente
Agitación	escasa	escasa	escasa

Crecimiento celular

Para la evaluación del crecimiento celular se empleó la densidad óptica, el peso seco y el conteo celular. La densidad óptica fue medida a 660 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific, con celda de 1 cm. Según Vázquez-Díaz & Robledo-Ramírez (2010) a dicha longitud de onda no hay interferencia con la absorbancia de la clorofila. El peso seco se obtuvo luego de concentrar la biomasa algal con el siguiente procedimiento: registro del peso constante de los viales, centrifugación de 5 ml del cultivo a 11000 rpm/20 min/15°C, eliminación del sobrenadante; secado de la muestra a $103 \pm 3^\circ\text{C}$ /2 horas (modificado de Córdoba & López, 2010), enfriamiento en desecador y posterior registro del peso. El conteo celular se realizó en la cámara Neubauer según metodología definida por Celeromics (2015), en un microscopio óptico Carl Zeiss, mediante objetivo 40x. Asimismo, con la observación al microscopio se monitoreo cualquier tipo de contaminación y cambios en la morfología y la pigmentación de las células. La cinética de crecimiento de las microalgas se determinó en los matraces, a partir del conteo celular (Huang & Su, 2014; Alvear, Castillo & Henao, 2011 y Becker 1994).

Contenido de lípidos totales

Los lípidos totales se estimaron para los cultivos en matraces y en reactores. Al obtener el peso seco microalgal con la metodología anterior, las muestras se congelaron a

-20°C para ser conservadas hasta el momento de la extracción de lípidos. El método empleado para dicha extracción fue una modificación del propuesto por Zhang *et al.* (2014). El procedimiento incluyó: aclimatación de las muestras a temperatura ambiente durante 12 horas, adición de 1,5 ml de la mezcla cloroformo y metanol grado analítico en proporción 2:1 (v/v), agitación en vórtex por 10 s, calentamiento a $60,5 \pm 3^\circ\text{C}$ / 1 hora, centrifugación a 4000 rpm/10 min/ 15°C , extracción de los solventes, evaporación del sobrenadante con N_2 UAP y baño de maría a $50 \pm 5^\circ\text{C}$, y cuantificación gravimétrica de los lípidos.

Perfil lipídico

El perfil lipídico se realizó únicamente a los cultivos en matraces, según una modificación al método de Rodríguez (2005), mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas y derivatización con trifluoruro de boro. Debido a la ausencia de estándares de aceites, se utilizaron 10 mg de margarina como patrón, para identificar los FAME presentes. El tratamiento de las muestras incluyó, adición de trifluoruro de boro al 10%, cierre hermético, calentamiento en aceite mineral a $85 \pm 5^\circ\text{C}$ /45 min, agitación magnética a 200 rpm y enfriamiento a temperatura ambiente. Los FAME se extrajeron con 3 ml de hexano y agitación en vortex por 1 min. Se tomaron 0,5 ml de la fase orgánica y se trasvasaron a nuevos viales, se aforaron con hexano a 1 ml, se agitaron en vortex por 15 s y se refrigeraron hasta los análisis. Para la identificación se inyectaron 2 μL de la solución, en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (HP) con columna capilar Agilent 19091s-133 HP-5MS, con flujo constante, flujo inicial de 1,0 mL/min, velocidad promedio de 37 cm/sec y outlet MSD. Las condiciones del inyector fueron, gas helio, modo *Split*, temperatura y presión iniciales de 250°C y 10,62 psi, respectivamente. La temperatura del horno fue de 100°C (5 min) @ 2°C hasta 136°C (5 min), luego @7 min hasta 250°C (25 min). El modo de adquisición de datos fue *Full Scan* y los análisis se hicieron por duplicado.

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica inicial de los medios de cultivo, μ tasa de crecimiento, t_d tiempo de duplicación, PB productividad de la biomasa, $\%LT$ porcentaje lípidos totales y PL productividad lipídica de MTVf, MTVsf, MRSm y MALL.

	DQO (mg/L-O ₂)	Fósforo total (mg/L-P)	Nitrato Amoniacal (mg/L-N)	pH	μ (d ⁻¹)	t_d (d)	PB (g/L/d)	$\%LT$ (relación biomasa seca)	PL (g/L/d)
MTVf	144,3	2,94	0,14	7,01	1,045±0,14	0,663	0,3716±0,05	21±0,9	0,0780± 0,01
MTVsf	188,8	4,04	0,24	7,80	0,695±0,09	0,990	0,1900±0,02	23±0,7	0,0437±0,01
MRSm	51,0	166,25	50,25	7,75	0,633±0,10	1,095	0,1638±0,02	24±0,6	0,0393±0,02
MALL	41,9	0,50	0,36	6,01	0,620±0,08	1,118	0,1008±0,03	17±1,0	0,0171±0,02

Resultados y Discusión

Características de los medios de cultivo

La caracterización fisicoquímica de los medios al inicio de los cultivos indicó diferencias en las concentraciones del nitrato amoniacal, fósforo total, DQO y pH (Tabla 2). MTVsf fue el medio con mayor contenido de DQO (188,8 mg/L-O₂), seguido por MTVf (144,3 mg/L-O₂). Por su parte, MRSm exhibió los niveles más altos de nitrato amoniacal (50,2 mg/L-N) y de fósforo total (166,2 mg/L-P) y MALL los valores más bajos en todos los parámetros. El pH inicial en los medios de cultivo osciló entre 6,01 y 7,80. Acerca de la coloración inicial de los medios, hay que destacar el color ámbar de MTVsf y MTVf y la alta turbiedad de MTVsf.

Los medios de cultivo empleados en este estudio definieron tres patrones generales iniciales: (1) altos niveles de C y limitación en N y P en el agua de techos verdes filtrada y sin filtrar, (2) escaso contenido de C y altas concentraciones de N y P en el agua sintética y (3) niveles limitados de los tres nutrientes en el agua lluvia filtrada. Estos patrones establecieron diversos radios de nutrientes, situación que influyó en el crecimiento y en los rendimientos de biomasa y aceites, como se verá más adelante.

Cultivo en matraces

Chlamydomonas sp. se adaptó a los sustratos disponibles y a las condiciones de cultivo establecidas en los matraces.

Sin embargo, se encontraron variaciones tanto en el crecimiento, como en la morfología, la productividad de la biomasa y de los lípidos, y en el tipo de ácidos grasos encontrados.

Cinética de crecimiento

En la literatura se encuentran diversos modelos cinéticos que buscan explicar el crecimiento de las microalgas mediante múltiples sustratos y condiciones de cultivo (Pruvost *et al.*, 2015; Kandilian, Tsao & Pilon, 2014; Lee *et al.*, 2014; Ación; Fernández & Molina, 2013; Costache *et al.*, 2013; Kliphuis *et al.*, 2012; Pruvost, Borgne & Legrand, 2008; Janssen, 2002; Nag-Jong *et al.*, 2002). A partir de las condiciones establecidas en esta investigación, se trabajó con el modelo cinético presentado por Huang & Su (2014), Alvear, Castillo & Henao (2011) y Becker (1994).

$$\mu = \ln(N_2/N_1)/t_2 - t_1 \quad (1)$$

$$t_d = \ln 2/\mu \quad (2)$$

Donde μ es la velocidad de crecimiento o tasa de crecimiento específico durante la fase exponencial; N_1 y N_2 el número de células al inicio y al final de dicha fase; t_1 y t_2 tiempo inicial y final, y t_d el tiempo de duplicación celular. La productividad de la biomasa se calculó a partir de Abdelaziz (2014).

$$PB = (B_f - B_o)/t \quad (3)$$

Donde B_f fue la concentración de la biomasa al final del cultivo, B_o la concentración al inicio y t el tiempo de cultivo.

Las curvas de crecimiento en los matraces se encuentran en la Figura 4. Según los registros de μ , t_d y PB obtenidos, el sistema que presentó la mayor tasa de crecimiento, el menor tiempo de duplicación y la productividad de biomasa más alta fue MTVf, seguido por MTVsf, MRSm y MALL (Tabla 2). Los valores de μ de este estudio ($0,62 \pm 0,08$ a $1,045 \pm 0,14 \text{ d}^{-1}$) son consistentes con los reportados para *Chlorella* sp. y *Neochloris oleoabundans*, con tasas de crecimiento que oscilan entre 0,3 y $4,63 \text{ d}^{-1}$ (Leite *et al.*, 2015; Giovanardi *et al.*, 2014; Huang & Su, 2014; Muthuraj *et al.*, 2014 y Rosenberg *et al.*, 2014). Asimismo, los tiempos de duplicación obtenidos (0,663 a 1,118 d) coincidieron con el rango de 0,275 a 1,375 d, citado para *Scenedesmus* sp. y *Scenedesmus dimorphus*, (Vidyashankar *et al.*, 2015). En relación a las productividades de la biomasa registradas ($0,1008 \pm 0,03$ a $0,3716 \pm 0,05 \text{ g/L/d}$), éstas son consistentes con lo reportado anteriormente para *Chlamydomonas* sp. con $0,134 \text{ g/L/d}$ (Renuka *et al.*, 2015) y *Chlorella* sp., *Chlorella vulgaris* y *Neochloris oleoabundans* con un rango de 0,105 a $0,5 \text{ g/L/d}$ (Chiu *et al.*, 2015; Renuka *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015 y Vaiciulyté *et al.*, 2014). La obtención de las máximas productividades de la biomasa para MTVsf y MTVf, es apoyada por las densidades ópticas OD660, con promedios máximos de $1,672 \pm 0,005$ para MTVsf, $1,409 \pm 0,002$ en MTVf, $0,327 \pm 0,001$ para MRSm y MALL con $0,118 \pm 0,001$.

En cuanto a las condiciones de cultivo, es importante mencionar que MRSm fue un cultivo consolidado, proveniente de tres batches anteriores. Caso contrario a lo sucedido con los demás medios, los cuales fueron la primera siembra realizada en agua lluvia y en agua de techos verdes. En cuanto a la coloración, todos los medios tomaron tonalidad verde durante el desarrollo del cultivo. Como se puede observar en la Figura 4, los cultivos no fueron sincrónicos debido a la disponibilidad de la muestra del agua lluvia, la cual fue recolectada semanas después

que la de techos verdes. Por tal motivo, las siembras se hicieron en momentos diferentes (dos semanas de diferencia) y los análisis de laboratorio se realizaron únicamente durante siete semanas, para así cumplir con los tiempos de trabajo definidos por el Departamento.

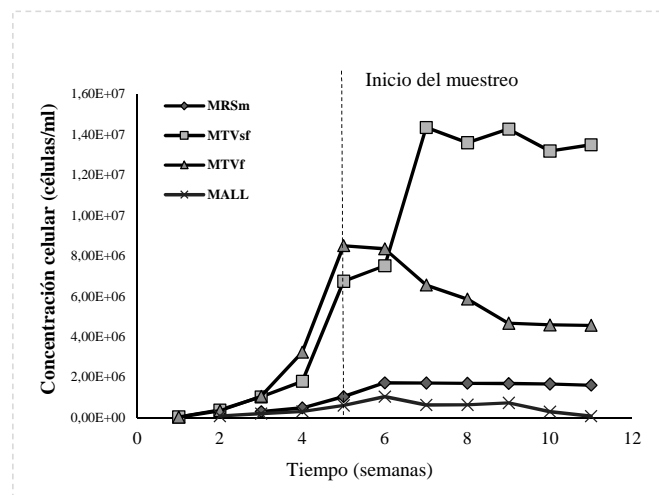


Figura 4. Curvas de crecimiento a partir del conteo celular promedio en MRSm, MTVsf, MTVf y MALL. Momento de inicio de los muestreos.

Las curvas de crecimiento revelan que las fases exponenciales coincidieron en alguna medida. Dicha fase se prolongó por cuatro semanas para MTVsf y dos semanas, para los demás cultivos. El R^2 de las líneas de tendencia exponencial fueron 1 para MTVf, 0,99 en MRSm y MALL, y MTVsf con 0,88. En relación a la fase estacionaria, la más amplia fue para MRSm, con cinco semanas, y cuatro, tres y una semana de duración, para MTVsf, MALL y MTVf, respectivamente. La etapa de declive se evidenció únicamente en MALL y MTVf.

Producción lípidos totales

El porcentaje de lípidos totales en relación a la biomasa seca y la productividad lipídica en los matraces se presentan en la Tabla 2. Dicho porcentaje se definió según Abdelaziz (2014).

$$\%LT = \frac{W_L}{W_B} * 100 \quad (4)$$

Donde W_L fue el peso de lípidos y W_B el peso seco de la biomasa algal. Asimismo, la productividad de los lípidos se estimó con la fórmula citada por Vaiciulyté *et al.*, (2014).

$$PL = PB * \%LT \quad (5)$$

Con PB como la productividad de la biomasa y $\%LT$, el porcentaje de lípidos totales.

Los porcentajes de lípidos totales obtenidos están en el rango de 17 ± 1 y $24 \pm 0,9\%$, siendo mayor el registro de MRSm, seguido por MTVf, MTVsf y MALL (Tabla 2). No obstante, en el caso de la productividad lipídica, MTVf obtuvo el valor más alto. Diferentes investigaciones han reportado porcentajes similares a los establecidos en este estudio, con $19,9\%$ para *Chlamydomonas debaryana* AT24 (Zhang *et al.*, 2014) y *Chlorella* sp., *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides* y *Scenedesmus* sp. en el rango de $16,17$ a 22% (Chiu *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015; Vidyashankar *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2014 y Huang & Su, 2014). Por su parte, las productividades de lípidos establecidos ($0,0171 \pm 0,02$ a $0,0780 \pm 0,01$ g/L/d) se aproximan o corresponden a lo reportado para *Chlorella* sp., *Chlorella vulgaris* y *Chlorella protothecoides* cuyo rango va de $0,02$ a $0,083$ g/L/d (Chiu *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015, Muthuraj *et al.*, 2014 y Vaiciulyté *et al.*, 2014). Aun cuando algunos autores recomiendan tener presente la producción de pigmentos, como variable que puede causar una sobreestimación de los lípidos totales (Rosenberg *et al.*, 2014), la valoración de clorofilas no hizo parte del alcance de este trabajo.

La obtención de los porcentajes más altos de lípidos totales, estuvo relacionada con las fases exponenciales. MTVsf, ERSm y MALL exhibieron dichos valores en la mitad de esa fase, mientras MTVf lo presentó al final de la misma.

Al revisar conjuntamente los parámetros de la cinética de crecimiento y la producción de biomasa y de bioaceites, se

evidencian diferentes estrategias en *Chlamydomonas* sp., para enfrentar las múltiples condiciones a las que fue sometida durante el cultivo en el agua sintética, el agua lluvia y el agua de techos verdes.

Estudios previos indican incrementos considerables en el porcentaje de lípidos totales con cifras entre 36 y 77% (Sun *et al.*, 2015; Vaiciulyté *et al.*, 2014; Mahapatra & Ramachandra, 2013; Valenzuela *et al.*, 2013). Dichos reportes están asociados a heterotrofia y mixotrofia o a condiciones de estrés como deficiencia de nitrógeno y fósforo, exceso de luz, temperatura y CO_2 y presencia de H_2O_2 , entre otros (Giovanardi *et al.*, 2014; Rosenberg *et al.*, 2014; Muthuraj *et al.*, 2014; Yilancioglu *et al.*, 2014). En ese orden de ideas, los porcentajes obtenidos en este trabajo podrían ser considerados como moderados y derivarse de condiciones de cultivo que no representaron situaciones de estrés tan severas, como las reportadas en la literatura, a crecimientos de tipo autótrofo o al no registro de los mayores rendimientos por haber iniciado los muestreos semanas después de la siembra. MTVf con un estimado de lípidos totales del $21 \pm 0,9\%$, no indicaría una desviación metabólica hacia mayores reservas de TAG, sino que estaría asociado con la mayor productividad de biomasa presentada. Esta situación es consistente con la concentración promedio más alta registrada en esta investigación, con $2,92 \pm 0,11$ g/L de lípidos totales, en el momento de mayor densidad celular para MTVf ($8,5 \times 10^6 \pm 3,2 \times 10^5$ células/ml). En el caso de MTVsf, se observaron dos procesos diferentes, en la parte media de la fase exponencial se da una relación proporcional entre biomasa y lípidos, donde las microalgas modulan su metabolismo entre la biosíntesis de lípidos y el crecimiento celular (Muthuraj *et al.*, 2014). Es así, como en ese momento se obtiene la concentración de lípidos totales más elevada para ese medio ($1,74 \pm 0,14$ g/L). Inmediatamente después, se da un descenso en la velocidad de crecimiento, evento que se observó durante una semana para luego retomar la

tendencia inicial. Sin embargo, en esa nueva etapa, la relación es inversa, y el descenso en el contenido lipídico puede ser el resultado de su utilización en la división y crecimiento celular (Valenzuela *et al.*, 2013). En consecuencia, al final de la fase exponencial, la densidad celular alcanza el valor de $1,44 \times 10^7 \pm 8,9 \times 10^5$ células/ml y la concentración lipídica desciende a $0,9 \pm 0,12$ g/L. En cuanto a MRSm, los parámetros indican que las células algales favorecieron la acumulación de moléculas energéticas, como lípidos, en lugar de consumirlos (Eustance *et al.*, 2015 y Yilancioglu *et al.*, 2014). Sin embargo, aunque MRSm presentó el mayor porcentaje de lípidos promedio (24%), su baja *PL* se debe a los bajos rendimientos en la biomasa. Por último, la limitación de nutrientes en MALL desde el inicio del cultivo (Tabla 2), explicaría tanto el escaso crecimiento celular, como las bajas productividades encontradas.

A partir de la caracterización fisicoquímica, es posible hacer algunas observaciones sobre la composición inicial de los medios de cultivo, el crecimiento y las productividades encontradas. Se ha observado que concentraciones elevadas de C combinadas con niveles mínimos de N y otros nutrientes como el P, inducen la acumulación lipídica (Fields *et al.*, 2014), lo cual se evidenció en los cultivos desarrollados en el agua de techos verdes filtrada y sin filtrar. Con respecto a la fuente de N, la literatura indica que según la especie y las condiciones de cultivo, el efecto puede variar. Para *Chlamydomonas* sp. se cita al amonio como una fuente de gran atención, debido al efecto adverso que puede tener en el crecimiento microalgal a pH alcalino (Eustance *et al.*, 2015 & Pruvost 2011) y la escasa estimulación para acumular lípidos (Remacle *et al.* 2014). Asimismo, Muthuraj *et al.* (2014) comparan diferentes fuentes de N en *Chlorella* sp. FC2 y encuentran que NH_4Cl y NH_4NO_3 son subóptimos para el desarrollo, y les atribuyen el menor crecimiento observado y el llegar rápidamente a la fase estacionaria. El agua

sintética utilizada (RSm) contiene NH_4Cl y NaHCO_3 , lo cual permitió mantener el pH a niveles cercanos a 7. Aun así, la curva de crecimiento (Figura 4) presentó un comportamiento similar al descrito en *Chlorella* sp. FC2 con bajas productividades de biomasa y de lípidos. Acerca del pH, los valores registrados (Tabla 2) están dentro del rango de crecimiento óptimo para *Chlamydomonas* sp., 5,5-8,5 (Messerli *et al.*, 2005).

Los tiempos de crecimiento de las microalgas varían y dependen del tipo de organismo y de las condiciones ambientales y de cultivo, con períodos que pueden incluir días o semanas. Aunque en general, se buscan especies y procesos con los que sea factible obtener μ altos y *t_d* menores, para cosechar con más frecuencia y acelerar la producción (Huang & Su, 2014; Rosenberg *et al.*, 2014; Aguirre, Bassi & Saxena, 2013).

En esta investigación, se definieron intencionalmente condiciones de cultivo “subóptimas”, representadas por la ausencia de agitación y de suministro controlado de CO_2 , para evaluar la productividad de la biomasa y de los lípidos, en un sistema de cultivo menos intensivo en consumo energético, y en esos términos, que a futuro pudiera resultar más económico. A pesar de dichas condiciones “subóptimas”, las productividades registradas coinciden con investigaciones bajo parámetros controlados (mayores costos) y con tiempos de cultivo menores o similares, de 10 a 60 días (Leite *et al.*, 2015; Renuka *et al.*, 2015 Sun *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014 y de Zhang, Wu & Hu, 2014). A partir de lo anterior, es importante anotar que buscar maneras de simplificar el proceso de cultivo, puede ser una forma de viabilizar la producción del biodiesel derivado de microalgas. Es así como las condiciones empleadas en este estudio, no necesariamente definen un método de cultivo desfavorable o ineficiente. Asimismo, hay que tener en cuenta que los mayores rendimientos se registraron durante la segunda (MALL), tercera (MRSm) y cuarta semana de cultivo (MTVf y MTVsf) (Figura 4), siendo estos tiempos

los indicados para cosechar. Adicionalmente, es posible que por haber iniciado los análisis de laboratorio varias semanas después de realizar las siembras, no se hayan registrado las mayores productividades lipídicas. Por tal motivo, sería importante efectuar el monitoreo desde el inicio de los cultivos para identificar el momento exacto de los mayores rendimientos.

Perfil lipídico

Los perfiles se realizaron únicamente a los cultivos en matraces, a partir de los lípidos extraídos durante la cuarta semana de muestreo (Figura 4), la cual correspondió a la fase de declive para MTVf y a la fase estacionaria en MTVsf, MRSm y MALL. Dichos resultados indicaron la presencia de aceites en el rango de C12:0 a C20:0; sin embargo, la cuantificación no fue posible debido a la ausencia de estándares. En la Tabla 3 se presentan los ácidos grasos que la técnica identificó con una probabilidad

0,5. Los FAME registrados en todos los medios fueron C12:0, C14:0 y C18:0. Adicionalmente, MTVsf presentó C16:0, C16:1 y C18:3, y MTVf C18:3 y C20:0. La composición de FAME obtenida, coincide con los ácidos grasos reportados en *Chlamydomonas debaryana* (Zhang *et al.*, 2014), *Chlorella* sp (Chiu *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015), *Chlorococcum* sp. (Mahapatra & Ramachandra, 2013), *Scenedesmus* sp. (Vidyashankar *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2014) y *Phaedactylum tricornutum* (Valenzuela *et al.*, 2013). La presencia de ácidos grasos saturados (C16) e insaturados (C18) es un tema crítico en la definición de la calidad del biodiesel; mientras los saturados contribuyen a incrementar la estabilidad oxidativa, la fracción insaturada favorece las propiedades de flujo a bajas temperaturas (Sun *et al.*, 2015; Muthuraj *et al.*, 2014). A partir de esto, se puede decir que MTVsf fue el cultivo con la composición de FAME más adecuada para la obtención de biodiesel de buena calidad, es así como altos contenidos de DQO, niveles bajos de nitrato amoniacal y fósforo total y alta turbiedad estimulan dicha composición de ácidos grasos.

No obstante, es importante conocer las fracciones porcentuales porque niveles elevados de ácidos grasos insaturados afectan la estabilidad oxidativa (Vidyashankar *et al.*, 2015). Con respecto a los estándares de calidad para el biodiesel, no fue posible realizar ningún tipo de análisis por falta de presupuesto.

Tabla 3. Composición de los FAME presentes en MRSm, MTVsf, MTVf y MALL. x presencia con una probabilidad 0,5.

	MRSm	MTVsf	MTVf	MALL
ácido láurico C12:0	X	X	X	X
ácido mirístico C14:0	X	X	X	X
ácido palmítico C16:0	-	X	-	-
ácido palmitoléico C16:1	-	X	-	-
ácido esteárico C18:0	X	X	X	X
ácido linoléico C18:3	-	X	X	-
ácido araquídico C20:0	-	-	X	-

Por otro lado, las cromatografías revelaron la presencia de múltiples hidrocarburos, los cuales no fueron identificados por no contar con estándares. Según la literatura, los extractos de hidrocarburos pueden ser usados directamente y reducir los costos asociados al consumo de energía durante la transesterificación, y se pueden mezclar con diésel de petróleo o usar como aditivos en diésel o combustible para aviones (Vidyashankar *et al.*, 2015). A través de los resultados registrados en los cultivos en matraces, es evidente la gran capacidad que *Chlamydomonas* sp. posee para enfrentar, tolerar y adaptarse a ambientes diversos, estrategias que se ven reflejadas tanto en la cinética de crecimiento, como en la productividad lipídica y la composición de los FAME. MTVsf y MTVf fueron los medios con las mejores productividades de biomasa y de lípidos, y los únicos con la presencia de los FAME indispensables, en la generación de biodiesel de buena calidad.

Cultivo en Reactores

Crecimiento

En los reactores se utilizó agua sintética, agua lluvia filtrada y agua de techos verdes filtrada, no hubo cultivo en agua de techos verde sin filtrar (Figura 5). El tiempo de inicio de los cultivos en los reactores no fue simultáneo. RRSm fue inoculado a finales de julio y RTV y RALL en septiembre. Es así como el cultivo en RRSm fue más estable en comparación con los otros medios, y es posible que de haber contado con más tiempo de desarrollo, RTV y RALL también hubieran podido alcanzar sus propios niveles de estabilidad. En todos los casos, el período de adaptación fue superior al requerido en los matraces, cuatro semanas para RRSm y cinco para RTV. A diferencia de lo presentado para EALL, en MALL no fue visible el desarrollo del cultivo. Aunque en la revisión microscópica se realizó conteo celular en MALL, la biomasa fue muy limitada y por tanto, no fue posible la cuantificación de lípidos.

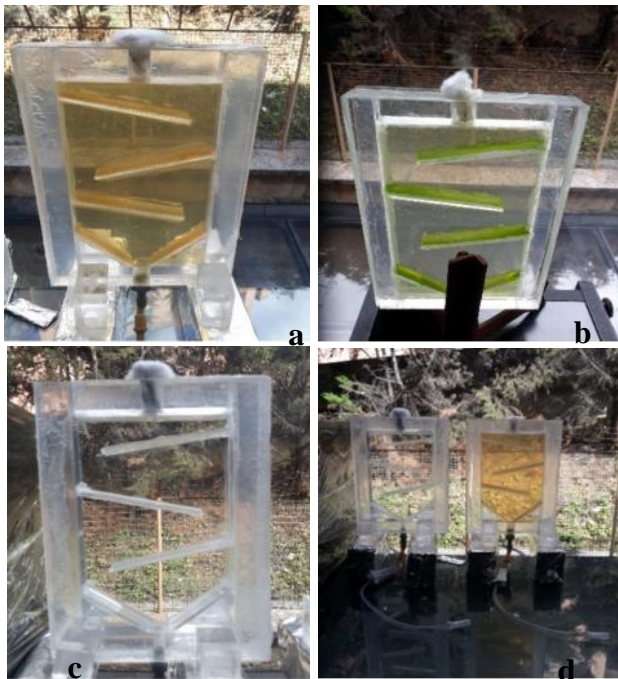


Figura 5. Cultivos en los reactores con agua sintética, agua lluvia y agua de techos verdes como sustrato. a) RTV, b) RRSm, c) RALL, d) Sistema de cultivo.

RRSm fue el cultivo utilizado para definir las condiciones de operación. El único parámetro que se controló fue el tiempo de adición y de extracción de medio. Durante tres semanas, se modificaron las frecuencias (entre 1 y 5 días) y se monitoreó el pH. Si bien, no se notó un cambio en el pH, se definió una frecuencia de 2 días para alimentar los reactores con 5 ml de medio fresco (TRH= 120 días).

La condición más característica en los reactores, fue la marcada variación en la cantidad de biomasa disponible al momento de la cosecha. Durante el desarrollo del cultivo, algunas microalgas se encontraban suspendidas en el medio y otras sedimentadas en las rampas. El eventual desplazamiento de las células se dio, al adicionar y extraer medio, y por la acumulación de microalgas y su posterior deslizamiento a los niveles inferiores. Por tal motivo, la concentración celular fue variable en el efluente y no permitió evaluar la cinética de crecimiento (Figura 6). En la medida en que RRSm fue un cultivo más maduro, los registros de biomasa fueron superiores. En cuanto a la coloración de los medios, al momento de elaborar este documento, la coloración de MTV y RALL continuaban siendo ámbar y transparente, respectivamente.

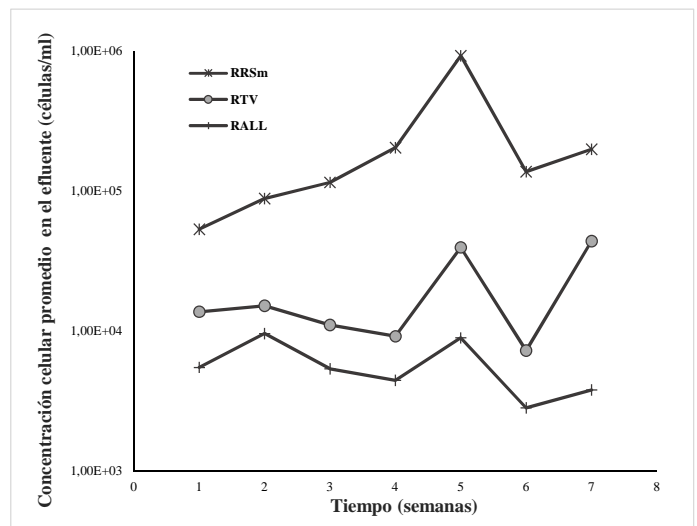


Figura 6. Variaciones en las concentraciones celulares promedio obtenidas en el efluente de RRSm, RTV y RALL.

Producción lípidos totales

Las concentraciones promedio de los lípidos totales en el efluente se encuentran en la Figura 7. Por su parte, los porcentajes lipídicos para RRSm y RTV fueron 23 y 19% respectivamente, los cuales difieren un poco de los obtenidos en los matraces (Tabla 2), en particular para RTV, pero un punto a considerar es la etapa de desarrollo del cultivo y las variaciones en la cantidad de microalgas cosechadas. Los valores reportados para fotobiorreactores tipo plano, están en el orden del 27 y 50% (Sun *et al.*, 2015, Vaiciulyté *et al.*, 2014 y Pribyl, Cepak & Zachleder, 2012), cifras que superan a las obtenidas en el presente estudio. Sin embargo, la proximidad de los porcentajes en RRSm y ERSm indica, que el reactor diseñado realmente permite el cultivo sostenido de microalgas y la producción de bioaceites, en cantidades similares a las alcanzadas en los matraces.

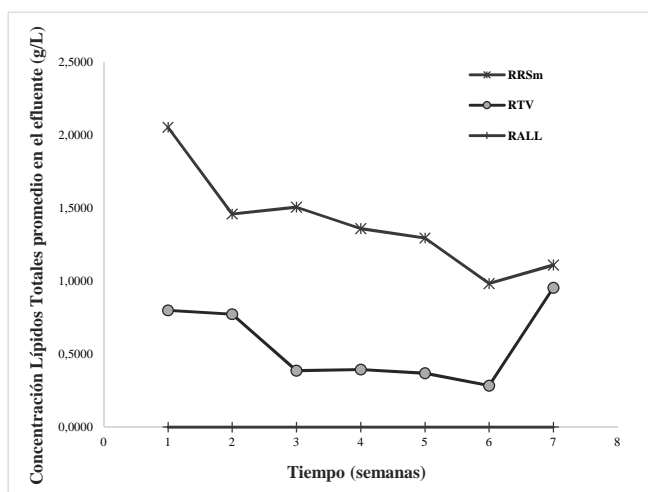


Figura 7. Variaciones en las concentraciones promedio de lípidos totales en el efluente de RRSm, RTV y RALL.

A partir del desempeño visto en los reactores durante los meses de funcionamiento, algunas modificaciones que se podrían hacer con el fin de mejorar los rendimientos y facilitar la operación serían: adicionar dos orificios en la parte superior para mayor ingreso de CO₂, e incrementar el ángulo de inclinación de las rampas (> 20°) con la

intención de lograr cosechas más estables. Antes de proyectar el escalamiento del proceso sería necesario (1) implementar y evaluar las modificaciones propuestas en el reactor, y (2) monitorear las concentraciones de los sustratos y correlacionarlas con las mayores productividades de biomasa y de aceites y con la presencia y los porcentajes de los ácidos grasos saturados e insaturados, para así establecer la TRH óptima.

Microscopía

A través de las revisiones al microscopio se verificó la ausencia de contaminación en los cultivos y fue posible identificar algunas diferencias en las células de acuerdo al tipo de medio. Aunque no hubo acceso permanente a un micrómetro para la medición de las células, las fotografías fueron tomadas a 40x y no se editaron con la finalidad de tratar de mostrar los cambios en tamaño y en la cantidad de pigmentos producidos (Figura 8). En general, las células en RTV y EALL fueron más pequeñas y presentaron menor pigmentación. Adicionalmente, RRSm fue el único cultivo en el que se encontraron células agregadas en estado palmeloide (Figura 8e.).

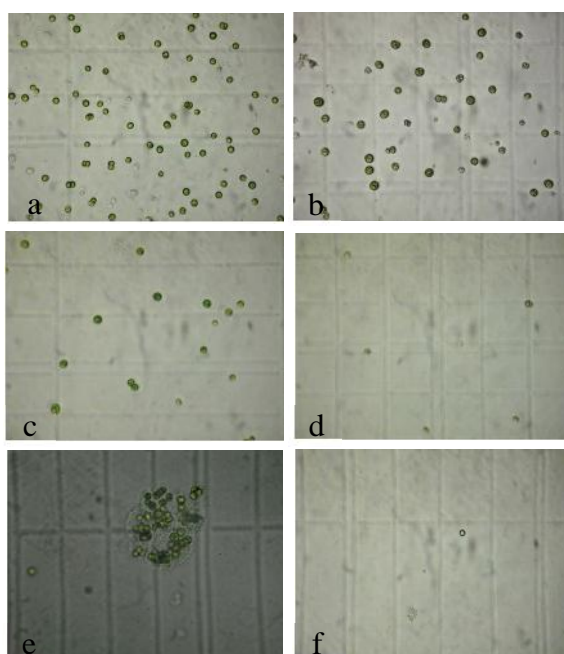


Figura 8. Fotografías de *Chlamydomonas* sp. a 40X. a) MTVsf, b) MTVf, c) MRSm, d) EALL, e) RRSm, f) RTV.

Sistema Integrado

El área de investigación sobre los techos verdes está en desarrollo y por tanto, hay una gran diversidad en cuanto a los tipos de sustratos, contenido de nutrientes y cubiertas vegetales. Emilsson *et al.* (2007) comparan las concentraciones de N y P en estructuras irrigadas con agua lluvia, con sustratos consolidados por más de seis meses, compuestos de suelo, arcilla y materia orgánica, y los rangos de nitrógeno amoniacal y fósforo total registrados en la escorrentía de los techos verdes oscilaron entre 0,0014-0,0013 mg/L y 0,0039-0,0028 mg/L. Asimismo, Glass (2007) reporta para techos verdes ASLA (American Society of Landscape Architects), valores promedio en el agua lluvia, de 9,1 mg/L de DQO, 1,3 mg/L de nitrato amoniacal, 3,4 mg/L de fósforo total y un pH de 7,0, y respectivamente en el efluente de los techos verdes, 49,5 mg/L, 1,2 mg/L, 8,3 mg/L y pH de 7,6. Por otro lado, con respecto a este trabajo, los niveles de DQO, nitrógeno amoniacal, fósforo total y pH fueron 41,9 mg/L, 0,36 mg/L, 0,5 mg/L y pH de 6,01 para el agua lluvia, y 188,8 mg/L, 0,24 mg/L, 4,04 mg/L y pH de 7,8 para la escorrentía de los techos verdes (Tabla 2). Como los datos indican, los tres estudios presentan diferentes valores y patrones en las concentraciones de los nutrientes, es así como la ubicación geográfica, el tipo de sustratos y la cubierta vegetal juegan un rol fundamental en la configuración y la dinámica de estas estructuras.

A partir de la revisión bibliográfica realizada, ésta sería la primera investigación encaminada a evaluar la viabilidad de utilizar agua lluvia y agua de techos verdes para cultivar microalgas y producir biodiesel, y de esta manera, se estaría fomentando un sistema integrado nuevo. En este punto, la pregunta obligada sería, qué tan sostenible podría llegar a ser este sistema? Para aclarar dicho interrogante es indispensable contextualizar su implementación. En primer lugar, para garantizar su sostenibilidad, no se podría pensar

a corto plazo, ni en iniciativas aisladas. Si bien, la ciudad de Bogotá carece de un sistema de manejo del agua lluvia, la Alcaldía Mayor y el IDIGER (Instituto Distrital de Gestión de Riesgos y Cambio Climático) actualmente trabajan en la creación de un Sistema de Drenaje Pluvial según el Decreto 528 del 24 de noviembre de 2014. En estos términos, la política distrital sobre este tema, considera la construcción de la infraestructura necesaria para almacenar y reutilizar el agua lluvia. De esa manera, se facilitaría la disponibilidad del medio de cultivo para las microalgas durante la época seca, y las concentraciones de nutrientes podrían ser más homogéneas. En la actualidad, hay experiencias particulares como las de Ciudad Verde, Home Center y Colsubsidio, donde el manejo de la escorrentía les ha permitido ahorrar recursos importantes y contribuir a la sostenibilidad ambiental (A. Ospina, comunicación personal, octubre 2014).

En relación a la factibilidad económica, este proceso se debería evaluar como un sistema integrado. Su rentabilidad no sólo debería incluir los valores de uso directo, sino todos los activos ambientales (CBD, 2007) y los beneficios sociales generados (Blackhurst, Hendrickson & Matthews, 2010), a partir del manejo del agua lluvia, pasando por los elementos paisajísticos, la reducción de GEI y del efecto isla de calor, la generación de múltiples coproductos, la reutilización de la biomasa microalgal, etc. De igual manera, habría que considerar la posibilidad de que a futuro se pudiera vender al sistema energético nacional, la energía producida a partir del biodiesel generado en el sistema, según lo reglamentado en la Ley 1715 del 13 de mayo de 2014.

Conclusiones y Recomendaciones

El agua sintética, el agua lluvia y el agua de techos verdes filtrada y sin filtrar aportan sustratos que influyen de manera diferente en el crecimiento de *Chlamydomonas* sp y en su capacidad para producir bioaceites. Dicho efecto

diferencial se evidencia en las variaciones presentadas tanto en la cinética de crecimiento, como en las productividades de biomasa y de lípidos, y en el tipo de ácidos grasos identificados. MTVsf y MTVf fueron los sistemas de cultivo más adecuados por las altas tasas de crecimiento, las productividades superiores y la presencia de C16:0, C16:1 y C18:3. Es así, como concentraciones elevadas de DQO, niveles bajos de N y P y la presencia de turbiedad, favorecen la producción de los ácidos grasos de importancia en la industria del biodiesel.

El reactor diseñado y evaluado en el presente estudio permite el cultivo sostenido de la microalga *Chlamydomonas* sp. y la producción de bioaceites. Sin embargo, el tipo de sustrato seleccionado juega un papel fundamental, al momento de garantizar el desarrollo del cultivo. Es viable el cultivo en RRSm y RTV en términos de producción de biomasa y de cuantificación de lípidos.

Buscar maneras de simplificar el proceso de cultivo puede ser una forma de viabilizar la producción del biodiesel derivado de microalgas. Las condiciones establecidas en este trabajo, no necesariamente definen un método de cultivo desfavorable o ineficiente.

Los resultados presentados en este estudio indican el potencial que puede tener el desarrollo de un sistema integrado de manejo de agua lluvia y de cultivo de microalgas para producir biodiesel, en la ciudad de Bogotá. En ese orden de ideas, se requieren estudios adicionales para evaluar las modificaciones en el reactor y su operación en exteriores, el escalamiento y la sostenibilidad en el suministro del medio de cultivo, entre otros aspectos.

Referencias

Abdelaziz, A. 2014. *Isolation and Identification of Native Microalgae for Biodiesel Production* (Master Thesis). Université de Montréal, Montréal. Recuperado del sitio

https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/10908/Abdelaziz_Ahmed_2014_memoire.pdf?sequence=4

Acién, F. G., Fernández, J. M., & Molina, E. (2013). Photobioreactors for the production of microalgae. *Rev, Environ Sci Biotechnol*, 12, 131 – 151. DOI: 10.1007/s11157-012-9307-6

Aguirre, A-A., Bassi, A & Saxena, P. (2013). Engineering challenges in biodiesel production from microalgae. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33 (3), 293-308. DOI: 10.3109/07388551.2012.695333

Alcaldía Mayor de Bogotá D.C. (2014). Decreto 528 del 24 de noviembre de 2014. Recuperado de <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=60065>

Álvarez, L. (2013). *Análisis de la Escorrentía Subsuperficial en Cubiertas Experimentales de pasto Kykuyo (*Penisetum clandestinum*)*. (Tesis Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Recuperado de <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8989/1/AlvarezCasta%20BledaLinaMaria2013.pdf>

Alvear, M. R., Castillo, C. R. & Henao, D. L. (2011). *Evaluación del pH y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chorella nativa* como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel* (Tesis Pregrado). Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, D. T. y C. Recuperado del sitio <http://190.25.234.130:8080/jspui/bitstream/11227/121/1/Tesis%20Unicartagena.pdf>

American Public Health Association., American Water Works Association., & Water Environment Federation. (2012). *Standard methods for the*

- examination of water and wastewater. 22nd ed.* Washington, DC: American Public Health Association.
- Becker, E.W. (E. Wolfgang). (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology/ E.W. Becker.* Cambridge: Cambridge University Press. Recuperado de <https://books.google.co.in/books/about/Microalgae.html?id=KAKx4I7NWEYC>
- Blackhurst, M., Hendrickson, C., & Matthews, S. (2010). Cost-Effectiveness of Green Roofs. *Journal of Architectural Engineering*, 137 – 143. DOI: 10.1061/_ASCE_AE.1943-5568.0000022
- Cantillo, Husserl & González. (2012). Optimización de consorcio alga-bacteria para degradación de fenol.
- Carter, T., & Butler, C. (2008). Ecological impacts of replacing traditional roofs with green roofs in two urban areas. *Cities and The Environment*, 1(2) article 9, 1-17. Recuperado de <http://digitalcommons.lmu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1020&context=cate>
- CATF. (2013). The Status of Algal Biofuel Development. Recuperado del sitio <http://www.catf.us/resources/whitepapers/files/201307-CATF%20Status%20of%20Algal%20Biofuels.pdf>
- Celeromics. (2015). Technical Note. Neubauer Chamber Formulae. Recuperado del sitio [http://www.celeromics.com/en/resources/Technical al%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/neubauer-chamber-cell-concentration.php](http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/neubauer-chamber-cell-concentration.php)
- CEPAL. (2009). Biocombustibles y comercio internacional: una perspectiva latinoamericana. Recuperado del sitio <http://www.eclac.cl/publicaciones/xml/1/36181/cw247e.pdf>
- CEPAL. (2011a). Implicaciones del desarrollo de los biocombustibles para la gestión y el aprovechamiento del agua. Recuperado del sitio <http://www.cepal.org/publicaciones/xml/4/45304/lcw0445e.pdf>
- CEPAL. (2011b). Estudio regional sobre economía de los biocombustibles 2010: temas clave para los países de América Latina y el Caribe. Recuperado del sitio <http://www.cepal.org/publicaciones/xml/4/45304/lcw0445e.pdf>
- Chen, Yi-F., & Wu, Q. (2011). Production of Biodiesel from Algal Biomass: Current Perspectives and Future. *Biofuels Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, 399-413. Recuperado del sitio <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123850997000188>
- Congreso de Colombia (2014). Ley 1715 del 13 de mayo de 2014. Recuperado de http://www.upme.gov.co/Normatividad/Nacional/2014/LEY_1715_2014.pdf
- Córdoba L., & López, L. (2010). *Obtención de aceite de microalgas nativas mediante la combinación de disrupción celular y método de extracción Soxhlet para la producción de biodiesel* (Tesis pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. Recuperado del sitio <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/6654/2/134809.pdf>
- Corzo, A., & Niell, X. (1991). C/N ratio in response to nitrogen supply and light quality in *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta: Ulvophyceae). *Sci. Mar.*, 55 (2), 405 – 411. Recuperado de

- <http://www.icm.csic.es/scimar/pdf/55/sm55n2405.pdf>
- Costache, T.A., Acién, F.G., Morales, M.M., Fernández-Sevilla, J.M., & Molina, E. (2013). Comprehensive model of microalgae photosynthesis rate as a function of culture conditions in photobioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 7627 – 7637. DOI: 10.1007/s00253-013-5035-2
- Emilsson, T., Berndtsson, J. C., Mattsson, J. E., & Rolf, K. (2007). Effect of using conventional and controlled release fertiliser on nutrient runoff from various vegetated roof systems. *Ecological Engineering*, 29, 260 – 271. Recuperado de <file:///D:/Downloads/controlled%20release.pdf>
- Eustance, E., Wray, J. T., Badvipoor, S., & Sommerfeld, M. R. (2015). The effects of limiting nighttime aeration on productivity and lipid accumulation in *Scenedesmus dimorphus*. *Algal Research*, 10, 33 – 40. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926415000880>
- Fábregas, J., M. Patiño, E. Vecino, F. Cházaro & A. Otero. 1995. Productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 43: 617-621. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00164763#page-1>
- FAO. (2003). Efecto de los biocombustibles en el medio ambiente. Recuperado del sitio <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100s/i0100s05.pdf>
- FAO. (2014a). Aquaticbiofuels. Recuperado del sitio <http://www.fao.org/bioenergy/aquaticbiofuels/conocimiento/es/>
- FAO. (2014b). Aquaticbiofuels. Recuperado del sitio <http://www.fao.org/bioenergy/aquaticbiofuels/aquaticbiofuels-home/es/>
- Farooq, W., Suh, W. I., Park, M. S., Yang, J-W. (2015). Water use and its recycling in microalgae cultivation for biofuel application. *Bioresour Technol*, 184, 73 – 81. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414015727>
- Fields, M. W., Hise, A., Lohman, E. J., Bell, T., Gardner, R. D., Corredor, L., Moll, D., Peyton, B. M., Characklis, G. W., & Gerlach, R. (2014). Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98 (11), 4805 – 4816. DOI 10.1007/s00253-014-5694-7
- Ferrans, P. (Enero, 2016). Cubierta vegetal de los techos verdes. Comunicación personal.
- Geider, R. J., & La Roche, J. (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur.J. Phycol.*, 37, 1-17. DOI: 10.1017/S0967026201003456
- Getter, K. L., & Rowe, D. B. (2006). The Role of Extensive Green Roofs in Sustainable Development. *HortScience*, (41) 5, 1276 – 1285. Recuperado de <http://hortsci.ashspublications.org/content/41/5/1276.full.pdf+html>
- Giovanardi, M., Baldissarotto, C., Ferroni, L., Longoni, P., Cella, R., & Pancaldi, S. (2014). Growth and lipid synthesis promotion in mixotrophic *Neochloris oleoabundans* (Chlorophyta) cultivated with

- glucose. *Protoplasma*, 251, 115 – 125. DOI: 10.1007/s00709-013-0531-x
- Glass, C.C. (2007). *Green Roof Water Quality and Quantity Monitoring* (ASLA). Recuperado de American Society of Landscape Architects https://www.asla.org/uploadedFiles/CMS/Green_Roof/Green_Roof_Water_Monitoring_Report.pdf
- Guerrero, G., & Gámez, P. (2014). *Evaluación y Pre-diseño de Cubiertas Verdes para la Reutilización de Aguas Lluvias en la Universidad Militar Nueva Granada: Una Perspectiva desde una Universidad Saludable*. (Tesis Pregrado). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá. Recuperado de <http://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/10654/11478/2/Evaluaci%C3%B3n%20y%20predise%C3%B1o%20de%20techos%20verdes.pdf>
- Harris, E. H. (1989). *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. San Diego, California: Academic Press, INC.
- Harris, E.H. (2001). Chlamydomonas as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 363 – 406. Recuperado de http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.52.1.363?url_ver=Z39.88-2003&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=arplant.2
- Hochman; G., & Zilberman, D. (2014). Algae Farming and Its-Bioproducts. In M. C. McCann; M. R. Buckridge & N. C. Carpita (Ed.), *Plants and Bioenergy* (pp. 49 – 64). New York: Springer. DOI: 10.1007/978-1-4614-9329-7
- Hu, Q., Zeng, R.,Zhang, S-X., Yang, Z-H., & Huang, H. (2014). Production of Microalgal Lipids as Biodiesel Feedstock with Fixation of CO₂ by *Chlorella vulgaris*. *Food Technol. Biotechnol.*, 52 (1), 285 – 291. ISSN 1330-9862
- Huan, Y-T., Su, C-P. (2014). High lipid content and productivity of microalgae cultivating under elevated carbón dioxide. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 11, 703 – 710. DOI: 10.1007/s13762-013-0251-y
- Huang, Y-T., & Su, C-P. (2014). High lipid content and productivity of microalgae cultivating under elevated carbon dioxide. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 11, 703 – 710. DOI: 10.1007/s13762-013-0251-y
- Janssen, M. (2002). *Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield* (Thesis). Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. Recuperado de <http://web.mit.edu/~pweigele/www/AlgalFuel/Janssen%20thesis%20-%20cultivatio.pdf>
- Kandilian, R., Tsao, T-C., & Pilon, L. (2014). Control of incident irradiance in a batch operated flat-plate photobioreactor. *Chemical Enginnering Science*, 119, 99 – 108. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250914004011>
- Kliphuis, A. M. J., Klok, A. J., & Martens, D. E., Lamers, P. P., Janssen, M., & Wijffels, R. H. (2012). Metabolic modeling of *Chlamydomonas reinhardtii*: energy requirements for photoautotrophic growth and maintenance. *J. Appl Phycol*, 24, 253 – 266. DOI: 10.1007/s10811-011-9674-3
- Lee, E., Pruvost, J., He, X, Munipalli, R., & Pilon, L. (2014). Design tool and guidelines for outdoor photobioreactors. *Chemical Engineering Science*, 106, 18 – 29. DOI: 10.1016/j.ces.2013.11.014

- Lee, K., Eisterhold, M. L., Rindi, F., Palanisami, S., & Nam, P. K. (2014). Isolation and screen of microalgae from natural habitats in the Midwestern United States of America for biomass and biodiesel sources. *J Nat Sci Biol Med*, 5 (2), 333 – 339. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4121910/>
- Leite, G. B., Paranjape, K., Abdelaziz, E. M., Hallenbeck, P. C. (2015). Utilization of biodiesel-derived glicerol or xylose for increased growth and lipid production by indigenous microalgae. *Bioresources Technology*, 184, 123 – 130. Recuperado de [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960-8524\(14\)01549-1](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960-8524(14)01549-1)
- Liang, Y., Sarkany, S., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett*, 31, 1043–1049. DOI 10.1007/s10529-009-9975-7
- Mahapatra, D. M., & Ramachandra, T.V. (2013). Algal biofuel: bountiful lipid from *Chlorococcum* sp. proliferating in municipal wastewater. *Current Science*, 105 (1), 47 – 55. Recuperado de http://wgbis.ces.iisc.ernet.in/energy/paper/cs_algal_biofuel/results.htm
- Messerli, M. A., Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E., Jung, S-K., Smith, P. J.S., & Sogin, M. L. (2005). Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukariotic acidophile. *Journal of Experimental Biology*, 208, 2569 – 2579. DOI: 10.1242/jeb.01660
- Michigan State University. (2015). Benefits of Green Roofs. Recuperado de: <http://www.hrt.msu.edu/greenroof/benefits/index.html>
- Muthuraj, M., Kumar, V., Palabhanvi, B., & Das, D. (2014). Evaluation of indigenous microalgal isolate *Chlorella* sp. FC2 IITG as a cell factory for biodiesel production and scale up in outdoor conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41, 499 – 511. DOI: 10.1007/s10295-013-1397-9
- Nag-Jong, K., Suh, I. S., Hur, B-K., & Lee, C-Y. (2002). Simple Monodimensional Model for Linear Growth Rate of Photosynthetic Microorganisms in Flat-Plate Photobioreactors. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 12 (6), 962 – 971. Recuperado de http://www.researchgate.net/publication/244386154_Simple_Monodimensional_Model_for_Linear_Growth_Rate_of_Photosynthetic_Microorganisms_in_Flat-Plate_Photobioreactors
- Oberndorfer, E., Lundholm, J., Bass B., Coffman, R.R., Doshi, H., Dunnett, N., Gaffin, S., Kohler, M., Liu, K.Y., & Rowe, B. (2007). Green Roofs as Urban Ecosystems: Ecological Structures, Functions, and Services. *Bioscience*, 27 (10), 823-833. Recuperado de <http://bioscience.oxfordjournals.org/content/57/10/823.full.pdf>
- Ospina, A. (septiembre, 2014). Certificación LEED. Comunicación personal.
- Oviedo, N. (2012). *Estudio de la Atenuación de la Escorrentía en Techos Verdes en Altos de Cazucá, Soacha*. (Tesis Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Recuperado de
- Park, J.W., Na, S. C., Nguyen, T.Q., Paik, S-M., Kang, M., Hong, D., Choi, I.S., Lee, J-H., & Jeon, N. L. (2015). Live Cell Imaging Compatible Immobilization of *Chlamydomonas reinhardtii* in Microfluidic Platform for Biodiesel Research.

- Biotechnology and Bioengineering*, 112 (3), 494 – 501. DOI: 10/1002/bit.25453
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L.E. & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45, 11 -36. Recuperado del sitio <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135410006019>
- Pérez-Morales, A., Martínez-López, A., & Camalich-Carpizo, J.M. (2015). Dry Weight, Carbon, C/N ratio, Hydrogen, and Chlorophyll Variation during Exponential Growth of Selected Microalgae species used in aquaculture. *Cicimar Océánides*, 30(1), 33-43. Recuperado de [file:///D:/Downloads/302-279-1-PB%20\(1\).pdf](file:///D:/Downloads/302-279-1-PB%20(1).pdf)
- Pribyl, P., Cepak, V., & Zachleder, V. (2012). Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella* and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94, 549 – 561. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-012-3915-5#page-1>
- Pruvost, J. (2011). Cultivation of Algae in Photobioreactors for Biodiesel Production. *Biofuels Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, 439-464. Recuperado del sitio <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123850997000188>
- Pruvost, J., Cornet, J.F., Le Borgne, F., Goetz, V., & Legrand, J. (2015). Theoretical investigation of microalgae culture in the light changing conditions of solar photobioreactor production and comparison with cyanobacteria. *Algal Research*, 10, 87 – 99. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926415000910>
- Pruvost, J., Le Borgne, F., & Legrand, J. (2008). Modelling Photobioreactors for Mass Scale Solar Production of Microalgae. Recuperado de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.172.1320&rep=rep1&type=pdf>
- Rajkumar, R., Yaakob, Z., & Takriff, M.S. (2014). Potential of the Micro and Macro Algae for Biofuel Production: A Brief Review. *BioResources*, 9 (1), 1 – 28. Recuperado de http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_09_1_Renganathan_Review_Algae_Biofuel/2600
- Ramapatra, D. M., & Ramachandra, T. V. (2013). Algal biofuel. Bountiful lipid from *Chlorococcum* sp. proliferating in municipal wastewater. *Current Science*, 105, 1,47 -55. Recuperado de http://wgbis.ces.iisc.ernet.in/energy/paper/cs_algal_biofuel/cs_biofuel.pdf
- Rasala, B.A., Chao, S-S., Pier, M., Barrera, D. J., & Mayfield, S. P. (2014). Enhanced Genetic Tools for Engineering Multigene Traits into Green Algae. *PLoS ONE*, 9 (4): DOI:10.1371/journal.pone.0094028
- Razzak, S.A., Hossain, M.M., Lucky, R.A., Bassi, A.S., & de Lasa, H. (2013). Integrated CO2 capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing – A review. Recuperado del sitio <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032113003663>
- Remacle, C., Eppe, G., Coosemans, N., Fernandez, E., & Vigeolas, H. (2014). Combined intracellular nitrate and NIT2 effects on storage carbohydrate metabolism in *Chlamydomonas*. *Journal of Experimental Botany*, 65 (1), 23 – 33. DOI: 10.1093/jxb/ert339

- Renuka, N., Sood, A., Prasanna, R., & Ahluwalia, A.S. (2015). Phycoremediation of wastewaters: a synergistic approach using microalgae for bioremediation and biomass generation. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, *12*, 1443 – 1460. DOI: 10.1007/s13762-014-0700-2
- Rodríguez, H. Determinación de aldehídos volátiles en aceites comestibles, por microextracción en fase sólida en el modo Headspace. (Tesis pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander. Recuperado de <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/489/2/118164.pdf>
- Rosenberg, J. N., Kobayashi, N., Barnes, A., Noel, E. A., Betenbaugh, M. J., Oyler, G. A. (2014). Comparative Analyses of Three *Chlorella* Species in Response to Light and Sugar Reveal Distinctive Lipid Accumulation Patterns in the Microalga *C. sorokiniana*. *PLoS ONE*, *9* (4): DOI: 10.1371/journal.pone.0092460
- Savage, P. E., & Hestekin, J. A. (2013). A Perspective on Algae, the Environment, and Energy. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, *32* (1), 877 – 883. DOI: 10.1002/ep
- Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J. & Mayfield, S. P. (2015). *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bioproducts production. *The Plant Journal*, *82* (3), 523-531. DOI: 10.1111/tpj.12780
- Secretariat of the Convention on Biological Diversity, (2007). *An Exploration of Tools and Methodologies for Valuation of Biodiversity and Biodiversity Resources and Functions*. Technical Series no. 28. Recuperado de <https://www.cbd.int/doc/publications/cbd-ts-28.pdf>
- Singh, R. N. & Sharma, S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *16*, 2347– 2353. Recuperado del sitio <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032112000275>
- Sun, Z., Zhou, Z-G., Gerken, H., & Liu, J. (2015). Screening and characterization of oleaginous *Chlorella* strains and exploration of photoautotrophic *Chlorella protothecoides* for oil production. *Bioresource Technology*, *184*, 53 – 62. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414013054>
- Tabernerero, A., Martín del Valle, E. M. & Galan, M. A. (2012). Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics. *Biochemical Engineering Journal*, *63*, 104– 115. Recuperado del sitio <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X11002993>
- USGBC. (2009). LEED Reference Guide for Green Building Design and Construction. Fort he Design, Construction and Major Renovations of Commercial and Institutional Building Including Core & Shell and K-12 School Projects. ISBN #978-1-932444-14-8
- Vaiciulyté, S., Padovani, G., Kostkevicienė, J., & Carlozzi, P. (2014). Batch Growth of *Chlorella vulgaris* CICALA 896 versus Semi-Continuous Regimen for Enhancing Oil-Rich Biomass Productivity. *Energies*, *7*, 3840 – 3857. DOI: 10.3390/en7063840
- Valenzuela, J., Carlson, R. P., Gerlach, R., Cooksey, K., Peyton, B. M., Bothner, B., & Fields, M.W. (2013). Nutrients resupplementation arrests bio-

- oil accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 97, 7049 – 7059. DOI: 10.1007/s00253-013-5010-y
- Vázquez-Díaz, R. & Robledo-Ramírez, D. (2010). Estudio de diferentes factores que afectan la producción de biomasa en *Chlamydomonas reinhardtii*. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*, 50, 3 – 8. ISSN 0188-5006
- Vidyashankar, S., VenuGopal, K.S., Swarnalatha, G. V., Kavitha, M. D., Chauhan, V. S., Ravi, R., Bansal, A.K., Singh, R., Pande, A., Ravishankar, G. A., & Sarada, R. (2015). Characterization of fatty acids and hydrocarbons of chlorophycean microalgae towards their use as biofuel source. *Biomass and Bioenergy*, 77, 75 – 91. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096195341500080X>
- Wang, B., Lan, C.Q. & Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, 30, 904–912. Recuperado del sitio <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975012000328>
- Wawrik, B., & Harriman, B. H. (2010). Rapid, colorimetric quantification of lipid from algal cultures. *Journal of Microbiological Methods*, 80, 262 – 266. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.01.016
- Weyer, K.M., Bush, D. R., Darzins, A & Willson, B.D. (2010). Theoretical Maximum Algal Oil Production. *Bioenergy Research*, 3 (2), 204-213. DOI: 10.1007/s12155-009-9046-x
- Woods, J., & Kalas, N. (2014). Can Energy Policy Drive Sustainable Land Use? Lessons from Biofuels Policy Development Over the Last Decade. In M. C. McCann; M. R. Buckeridge & N. C. Carpita (Ed.), *Plants and Bioenergy* (pp. 13 – 33). New York: Springer. DOI; 10.1007/978-1-4614-9329-7
- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., & Cetiner, S. (2014). Oxidative Stress is a Mediator for Increased Lipid Accumulation in a Newly Isolated *Dunaliella salina* Strain. *PLoS ONE*, 9(3), DOI: 10.1371/journal.pone.0091957
- Zhang, B., Wang, L., Hasan, R. & Shahbazi, A. (2014). Characterization of a Native Algae Species *Chlamydomonas debaryana*: Strain Selection, Bioremediation Ability, and Lipid Characterization “*Chlamydomonas debaryana*,” *BioResources* 9 (4), 6130-6140.
- Zhang, T-Y., Wu, Y-H., & Hu, H-Y. (2014). Domestic wastewater treatment and biofuel production by using microalga *Scenedesmus* sp. ZTY1. *Water Science & Technology*, 69 (12), 2492 – 2496. DOI: 10.2166/wst2014.160

