

Evaluación del efecto de la concentración de CO₂ en un cultivo de *Chlorella sp.* y su aplicación en la industria

Diego Bustos Torres

Director

Ing. Abraham Korman

Facultad de Estudios Ambientales y Rurales - Departamento de Ecología y Territorio

Pontificia Universidad Javeriana

Codirector

Fabio Roldán, Ph.D.

Facultad de Ciencias - Departamento de Biología

USBA Pontificia Universidad Javeriana

Trabajo de grado para optar al título de

Magister en Energía y Sostenibilidad

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE INGENIERÍA – FACULTAD DE ESTUDIOS AMBIENTALES Y RURALES

Bogotá D.C.

2022

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se ve en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios por permitirme vivir la experiencia de compartir con todas las personas que hicieron parte de este proceso. En especial y de manera sincera a mis directores Ing. Abraham Korman y Dr. Fabio Roldán por el apoyo, la paciencia, las rigurosas palabras, risas, y en especial el tiempo dedicado y el haberme facilitado los medios para la elaboración de las actividades para que este trabajo concluyera de la mejor manera.

A la Dra. Aura Marina Pedroza por la guía que me brindó en el inicio de este trabajo, por las microalgas regaladas para el desarrollo experimental, su atención y disposición a cualquier duda que se me presentó.

A mi familia por el apoyo incondicional que siempre me han brindado, su disposición y espacios necesarios que me permitieron avanzar en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Hernando Camargo director de los laboratorios del Servicio Geológico Colombiano, a los coordinadores Jairo Álvarez y Héctor Enciso por poner a disposición todo el equipo profesional, técnico y físico necesario para llevar a cabo toda la fase experimental de este trabajo. En especial a mis compañeros de los grupos de Carbones, Aguas y Gases por su disposición a colaborar en toda esta fase experimental, ya que fue sin duda una experiencia muy enriquecedora. Y en general a toda la entidad.

A mi novia por la paciencia, el apoyo moral y su disposición que de alguna manera se vieron reflejados en el producto final de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. MARCO TEÓRICO.....	5
4.1. Las emisiones de gases de efecto invernadero	5
4.2. Generalidades de las microalgas	7
4.3. Aplicaciones de las microalgas.....	9
4.3.1. Microalgas en el ambiente	9
4.3.2. Microalgas en la industria	9
4.4. Cultivo de microalgas.....	11
4.4.1. Biorreactores.....	12
4.4.2. Medio de cultivo.....	13
4.4.3. Fuente de carbono	14
4.4.4. Fuente de Nitrógeno	16
4.4.5. Fuente de energía	16
4.4.6. Parámetros de cultivo	17
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos específicos.....	19
6. METODOLOGÍA.....	20
6.1. Origen de la microalga.....	20
6.2. Condiciones de crecimiento de cultivo.....	20
6.3. Parámetros cinéticos de crecimiento	21
6.3.1. Velocidad específica máxima de crecimiento (μ).....	21
6.3.2. Producción de biomasa (X).....	22
6.3.3. Productividad máxima de biomasa (P).....	22
6.3.4. Tasa máxima de captura de CO_2	22

6.3.5.	Eficiencia máxima de captura de CO ₂	22
6.4.	Montaje del sistema de suministro de CO ₂	23
6.5.	Diseño experimental.....	24
6.6.	Parámetros monitoreados durante el cultivo.....	25
6.6.1.	Determinación del crecimiento.....	25
6.6.1.1.	Determinación de biomasa.....	25
6.6.1.2.	Cuantificación de biomasa por densidad óptica (OD).....	25
6.6.2.	Determinación de nitrato y fosfato	25
6.6.3.	Determinación de pH y temperatura	26
6.6.4.	Cuantificación de proteína	26
6.6.5.	Determinación de carbono y nitrógeno totales	27
6.7.	Análisis estadístico.....	28
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
7.1.	Efecto de la adición de CO ₂ en el crecimiento de biomasa	28
7.1.1.	Producción de biomasa (X).....	31
7.1.2.	Productividad máxima de biomasa (P)	32
7.1.3.	Tasa máxima de captura de CO ₂ (R_{CO_2}).....	33
7.1.4.	Eficiencia de captura de CO ₂ (E_{CO_2}).....	33
7.2.	Remoción de nitratos y fosfatos durante el crecimiento del cultivo	35
7.3.	Monitoreo del pH y temperatura durante el crecimiento del cultivo	36
7.4.	Carbono total, nitrógeno total y proteína en la biomasa final.....	38
8.	USOS DE LA BIOMASA EN LA INDUSTRIA.....	41
8.1.	Microalgas como alimento	41
8.2.	Microalgas como fertilizantes.....	45
8.3.	Biorrefinerías a partir de microalgas	46
9.	CONCLUSIONES	47
10.	RECOMENDACIONES	48
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Medio de cultivo BBM modificado.....	20
Tabla 2 Diseño experimental para evaluar la captura de CO ₂ con microalgas del género <i>Chlorella</i> sp.	24
Tabla 3 Suministro de CO ₂ a las unidades experimentales.....	24
Tabla 4 Parámetros de crecimiento	32
Tabla 5 Tasa de captura y eficiencia de CO ₂	35
Tabla 6 Contenidos de proteínas en alimentos de origen animal y vegetal (Zanin, 2022)	42
Tabla 7 Aplicación industrial de las microalgas según biomoléculas que contienen (De Jesus Raposo et al., 2013; Priyadarshani & Rath, 2012)	43
Tabla 8 Contenido lipídico de microalgas (Ferreira Mota et al., 2022)	46
Tabla 9 Comparación entre microalgas y otras fuentes de aceite para la producción de biodiesel (Ferreira et al, 2022).....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Emisiones de CO ₂ por quema de combustibles fósiles	6
Figura 2 Esquema de la síntesis de la pared celular hija y rompimiento de la pared celular madre en <i>Chlorella</i> sp. a fase de crecimiento celular temprano. b fase de crecimiento celular tardío. c división de cloroplastos. d primera fase de división de protoplastos. e segunda fase de división de protoplastos. f maduración de células hijas. g fase de eclosión. (línea roja – pared celular hija, línea gris – pared celular madre).....	8
Figura 3 Curva de crecimiento celular.....	8
Figura 4 Bioreactores. a. Bioreactor abierto. b y c. Bioreactores cerrados	12
Figura 5 Concentración de las especies químicas del sistema carbonato en función del pH con concentración de CO ₂ 2.1 mmol . kg ⁻¹ (Souza et al., 2012)	15
Figura 6 Radiación directa con lámparas.....	17
Figura 7 Montaje de las unidades experimentales (1.9 L) en medio BBM modificado e iluminación LED	21
Figura 8 Montaje de cultivo de microalgas con suministro de gases en el laboratorio	23
Figura 9 Curva de calibración con patrón de albúmina para determinación de proteína en suspensión de microalgas	27
Figura 10 Crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. (g.L ⁻¹) alimentada con diferentes concentraciones de CO ₂ . Cultivo preliminar	29
Figura 11 Crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. (g _{ps} .L ⁻¹) alimentada con diferentes concentraciones de CO ₂ . Cultivo final.....	30
Figura 12 Cultivo final de <i>Chlorella</i> sp (día 10)	31
Figura 13 Consumo de nitrato (mg . L ⁻¹) en el cultivo de <i>Chlorella</i> sp. Cultivo final	36
Figura 14 Consumo de fosfato (mg . L ⁻¹) en el cultivo de <i>Chlorella</i> sp. Cultivo final.....	36
Figura 15 Comportamiento del pH en el cultivo de <i>Chlorella</i> sp. Cultivo preliminar	37
Figura 16. Comportamiento de la temperatura durante el cultivo de <i>Chlorella</i> sp. Cultivo preliminar	38
Figura 17 Concentración (%) de proteína, CT y NT a diferentes concentraciones de CO ₂ . Cultivo preliminar	39

Figura 18 Concentración (%) de proteína, CT y NT a diferentes concentraciones de CO ₂ . Cultivo final.....	40
Figura 19 Comparación entre varios estudios de las concentraciones (%) de carbono total, nitrógeno total y proteína.	41
Figura 20 Beneficios de las proteínas y péptidos de microalgas	43

RESUMEN

Los esfuerzos de la humanidad por mitigar el impacto de las emisiones de gases de efecto invernadero son necesarios con el fin de impedir el crecimiento de la temperatura más allá de 1.5 °C. Durante este trabajo se evaluó el efecto de la concentración de CO₂ sobre el cultivo de microalgas del género *Chlorella sp.* a escala de laboratorio. Luego de la revisión bibliográfica se evaluaron diferentes concentraciones de CO₂ (5, 10, 15 y 20%) en un flujo de aire y CO₂ (0.57 L.min⁻¹)(correspondientes a 0.33 vvm [mL de gas.ml⁻¹ de medio.min⁻¹]). El cultivo se expuso (24 h.d⁻¹) a luz led blanca (1000 lm). Se utilizó la cepa de *Chlorella sp.* en medio BBM (Bold Basal Medium) modificado.

Se determinó que esta microalga crece exponencialmente hasta los 10 días de cultivo bajo las condiciones utilizadas, mostrando el mayor crecimiento de biomasa con inyección de CO₂ al 15%. Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de CO₂ (20 y 15%). La eficiencia de captura de CO₂ fue baja en ambas condiciones (8.9 y 9.2%), motivo por el que se plantearon concentraciones de CO₂ en el flujo más bajas (5 y 10%). Se encontró que el flujo al 5% de CO₂ fue el más eficiente (27.0%).

Se recomienda suministrar dentro del flujo de gases óxidos de azufre y nitrógeno para simular los gases de combustión de carbón e hidrocarburos y profundizar en esta alternativa de conversión del CO₂ en compuestos orgánicos considerando el contenido de proteína de *Chlorella sp.* Por su contenido de proteína es una alternativa como suministro alimenticio para cultivos piscícolas o directamente como alimento en la dieta humana.

1. INTRODUCCIÓN

La generación de energía a nivel mundial sigue dependiendo en gran medida de los combustibles fósiles no renovables. China, Alemania y Estados Unidos son los principales consumidores mundiales de carbón, gas natural y petróleo, así como los mayores emisores de Gases de Efecto Invernadero (GEI). Las fuentes renovables se están implementando gracias a la reducción de los precios de los equipos y el avance de la tecnología para resolver problemas técnicos. Sin embargo, la transición energética sigue dándose lentamente.

Colombia tiene una matriz energética diversificada, compuesta en su mayoría por la generación hidráulica. Así, el nuevo CONPES (4075) aprobado por el gobierno presenta la hoja de ruta para multiplicar la capacidad instalada de fuentes no convencionales de energía 100 veces respecto a 2018 (DNP, 2022).

La reducción de CO₂ en la atmósfera es el objetivo de los miembros de la llamada conferencia de las partes de la ONU luego de conocer los últimos informes de *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) sobre la alteración del clima producto del efecto invernadero causado por el dióxido de carbono (CO₂) y otros gases provenientes específicamente de fuentes antropogénicas (IPCC Working Group II, 2022). El mercado de la energía tiene una demanda creciente y aún mayor a la luz del conflicto ruso-ucraniano, evidenciando la necesidad del mundo por el petróleo, gas y carbón como fuentes que generan seguridad en el suministro.

El aumento progresivo de la población ocasiona un incremento en la demanda de energía. La Agencia Internacional de Energía, publicó en el informe *World Energy Outlook 2* (IEA, 2021) su preocupación por los esfuerzos insuficientes para cumplir la meta de cero emisiones de CO₂ en el 2050; a pesar de los avances en transición energética de los países miembros de la COP.

Desde el inicio de la actividad industrial, paralizada por la pandemia del Covid-19, se incrementó el consumo de carbón en el hemisferio norte, especialmente en Europa, donde los precios del energético han alcanzado niveles históricos debido al invierno y la escases de gas natural (Sullivan, 2021). Actualmente, debido al conflicto ruso-ucraniano la escases de gas natural en Europa ha ocasionado un alza en los precios de los alimentos y energéticos donde el carbón alcanzó los

US\$462/ton (Roca, 2022) y el TTF (Title Transfer Facility - unidad utilizada para el comercio de gas en Europa) de gas los €102/MWh (Muñoz B., 2022).

La reactivación económica no solo ocasionó el aumento de precios, sino también generó el segundo mayor aumento de emisión de CO₂ anual de la historia (IEA, 2021). En el segundo semestre del 2021, China presentó apagones debido a su alta demanda de energía (Bayoud, 2021) y se generó un incremento en la demanda de energía durante el invierno en Europa. En este momento, la crisis geopolítica y las sanciones a los energéticos rusos y los confinamientos en China por el aumento de los contagios por Covid-19 generan fluctuaciones en los precios e incertidumbre en los suministros (RTVE, 2022).

Así, el carbón cobra fuerza como fuente de energía y volviendo nuevamente la polémica por esta fuente, al considerarse la más contaminante para el ambiente. Además según la IEA produciría un revés a los objetivos de *Net Zero Emissions by 2050 Scenario* (NZE) planteados para mantener el límite de un aumento máximo de 1.5°C en las temperaturas globales (IEA/Oecd, 2021). La creciente demanda de carbón por la crisis mundial actual generó un cambio en el flujo mundial de las energías fósiles. Lo que conlleva a sumar esfuerzos con el fin de buscar soluciones a las emisiones de CO₂ del carbón pues su uso no debería realizarse sin controlarlas.

Existen múltiples proyectos y tecnologías para mitigar el impacto de las emisiones de gases de efecto invernadero alrededor del mundo. Entre estos, la biotecnología ha brindado opciones a la industria de biocombustibles, alimentos, biocatalizadores entre otros (Rendueles & Diaz, 2014). Es preciso estudiar los procesos biológicos con el fin de mitigar la concentración de CO₂ en el aire. En este sentido, se revisó la literatura para identificar la manera natural más eficiente para capturar CO₂, encontrando que las microalgas son una muy buena opción, ya que son microorganismos que capturan CO₂ mientras liberan oxígeno a la atmósfera de manera mucho más rápida que otras especies fotosintéticas, al tiempo que pueden ser de utilidad.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de carbón, gas natural o petróleo para la producción de energía ocasiona impactos ambientales, especialmente elevando las concentraciones de CO₂ en el aire, ocasionando el

calentamiento global (IPCC Working Group II, 2022). Existen tecnologías para la captura de CO₂ por medio de procesos físicos y químicos que requieren el uso de plantas industriales; sin embargo, el costo de esta implementación es elevado y conduce al incremento de los precios de la energía que sumados con los precios actuales terminaría siendo inviable.

En este punto, una de las opciones investigadas para capturar CO₂ es el uso de microorganismos fotosintéticos que lo transforman en materia orgánica. Este proceso natural es el mismo con el que se ha conseguido por millones de años tener las concentraciones de CO₂ ideales para la producción de vida en la tierra. Teniendo en cuenta el potencial de las microalgas, los científicos estudian diferentes tipos de algas y microorganismos fotosintéticos con el fin de reducir el nivel de CO₂ en la atmósfera, desde la fuente que lo emite o el aire.

El IPCC informó la necesidad de implementar acciones para reducir las emisiones de GEI desde inicios del siglo XX, con la posibilidad de detener el crecimiento de la concentración, como se planteó en el COP 21 para el año 2050 y reforzado en las siguientes reuniones de la COP. Sin embargo, en la COP 26 se concluyó que los esfuerzos aún no son suficientes y el objetivo está lejos de cumplirse a pesar del avance en otros aspectos como disminución de la deforestación y reducción de emisiones de metano (CH₄)(EA, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

Colombia se comprometió en la COP 26 a reducir sus emisiones en 51% de CO₂ según las proyecciones de crecimiento para el año 2030 (Jiménez, 2021), mientras los países desarrollados se comprometieron a reducir sus emisiones, apoyar económicamente y tecnológicamente a los países en vía de desarrollo para no incrementar la temperatura en 1.5°C de la registrada en la época preindustrial. Los países miembros se comprometieron en la COP 26 con reducir sus emisiones para evitar pasar la citada meta fueron 192.

El IPCC estima que sin captura de CO₂ y desarrollo de nuevas tecnologías no se podrán lograr las metas de no sobrepasar los 1.5°C. Al respecto se revisaron las diferentes tecnologías, y la mayoría requieren disponer el CO₂ en reservorios geológicos o desarrollar procesos con el fin de posteriormente convertir el carbono en otros productos, mientras que el uso de microalgas en un solo proceso permite fijar el carbono en la biomasa. Por lo tanto, este trabajo se orientó hacia la

captura de CO₂ mediante el uso de microalgas, debido a su más fácil implementación y a que cuenta con la ventaja de producir biomasa como materia prima para las industrias de los biocombustibles, biomoléculas para la industria farmacéutica y alimenticia, abonos orgánicos para la agricultura, entre otros.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Las emisiones de gases de efecto invernadero

Los principales gases que conforman los gases de efecto invernadero son el CO₂, CH₄ y N₂O. Los países miembros de la ONU se han enfocado en la reducción de CO₂, ya que este compuesto es el principal producto de la combustión de hidrocarburos y carbón. Sin embargo, en la COP 26 se presentó la necesidad de mitigar las emisiones de todos los gases en especial del CH₄ buscando atacar el problema del calentamiento global desde los diferentes ángulos (ONU, 2021).

En Latinoamérica, el sector industrial y transporte consumen el 30 y 35% de la energía generada respectivamente. En consecuencia, son los sectores de mayor emisión de CO₂ (Figura 1b). La generación de energía proveniente de la combustión de combustibles fósiles en Latinoamérica y el Caribe en el 2020 alcanzó 562,807 (GWh), correspondiente a 36.3% del total de la región (Figura 1a). Donde el petróleo, gas natural y carbón son las principales fuentes emisoras de CO₂ (OLADE, 2022). Estos números han crecido sostenidamente en la medida del crecimiento económico de los países de la región, por lo que la importancia de controlar las emisiones de GEI si se tiene en cuenta los compromisos adquiridos como miembros de la COP.

En el informe de la OLADE, se proyecta para el año 2050, reducir a 12% la generación de energía proveniente de la combustión de combustibles fósiles, si se logra instalar el doble de la capacidad de generación renovable (823,000 MW) y retirar 81,000 MW de centrales térmicas no renovables (OLADE, 2022). En ese sentido, se debe implementar acciones con el fin de mitigar las emisiones de GEI correspondientes a ese 12%.

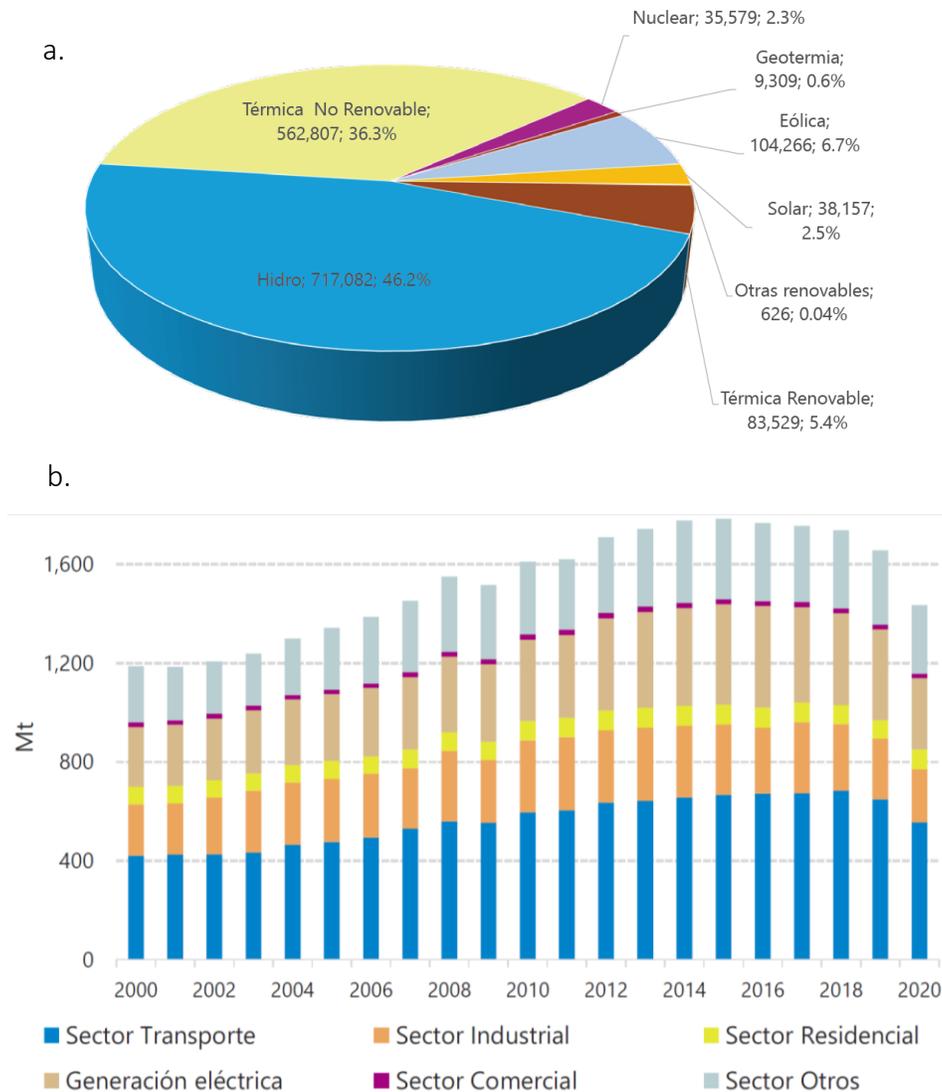


Figura 1a. generación de energía eléctrica en América Latina y el Caribe (GWh;%)(2020). b. Evolución de las emisiones de CO₂ por sector de consumo en millones de toneladas.

Tomada de OLADE, 2021

A nivel mundial, las emisiones de gases de efecto invernadero crecieron 50% entre los años 1990 y 2018. Un dato revelador que incluyen los últimos estudios es el cambio en el uso del suelo y la deforestación como fuente de gases GEI. Los países con mayor participación en las emisiones de gases efecto de invernadero son EE. UU., China, Rusia, Brasil e Indonesia. Estos dos últimos por la acelerada deforestación es sus territorios entran en este listado.

Un informe publicado por *Global Carbon Project* durante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el cambio Climático durante la COP 26, cuantificó una caída de 5.4% en las emisiones de GEI durante el 2020 a raíz de los confinamientos producidos por la pandemia del covid-19. Donde por esa misma razón, el único subsector que tuvo un alto consumo fue el residencial. Para el periodo postpandemia se observó un aumento de 4.9% respecto al 2020 (34,600 Mt) en las emisiones de GEI (C Gulsen, 2021).

4.2. Generalidades de las microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos donde su principal pigmento es la clorofila. El término microalga no tiene categoría taxonómica, pero es usado para nombrar a los grupos de microorganismos que comparten ciertas características en común con ciertas líneas evolutivas. Son microorganismos mucho más eficientes que las plantas terrestres para fijar CO₂ (H. Cheng et al., 2021) y producir oxígeno, también son la base de la cadena trófica en ecosistemas acuáticos (Milhazes & Otero, 2017).

La mayoría de las microalgas son fotoautótrofas utilizan el sol como fuente de energía para convertirla en energía química, la cual es almacenada en las moléculas de glucosa a través de la fotosíntesis oxigénica (Cervantes-Urieta et al., 2020), y pueden absorber CO₂ y HCO₃⁻ disuelto como fuente de carbono inorgánico. Adicionalmente, especies como *Chlorella sp.*, *Dunaliella sp.* tienen la capacidad de usar el carbono orgánico o inorgánico para sus procesos metabólicos (mixotropía); poseen una capacidad mayor de generación de biomasa en comparación con las plantas, ya que no necesitan generar sistemas complejos como los reproductores, lo que permite una velocidad de crecimiento y reproducción mucho más alta (La velocidad específica de crecimiento (μ) es la cantidad de biomasa generada por cada gramo de biomasa en determinada unidad de tiempo [h^{-1} o d^{-1}]).

El género *Chlorella sp.* consiste en microalgas esféricas, inmóviles, unicelulares con un solo cloroplasto. Las células de *Chlorella sp.* se reproducen asexualmente por mitosis, más comúnmente formando cuatro células hijas dentro de la célula parental. En la Figura 2 se observa el crecimiento de la pared celular de las células hijas, la separación de organelos. Finalmente,

cuando las células hijas han madurado, la pared celular parental se rompe y las células hijas se liberan (Borowitzka, 2018).

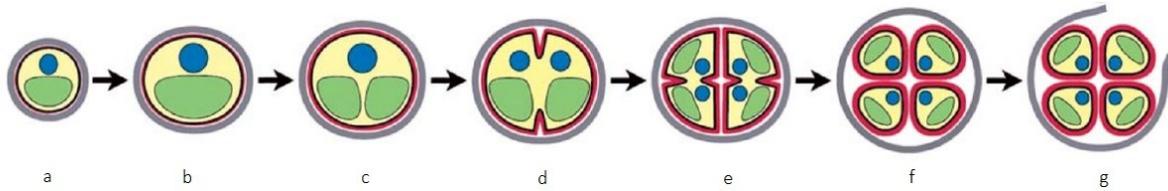


Figura 2 Esquema de la síntesis de la pared celular hija y rompimiento de la pared celular madre en *Chlorella* sp. **a** fase de crecimiento celular temprano. **b** fase de crecimiento celular tardío. **c** división de cloroplastos. **d** primera fase de división de protoplastos. **e** segunda fase de división de protoplastos. **f** maduración de células hijas. **g** fase de eclosión. (línea roja – pared celular hija, línea gris – pared celular madre)

Tomada de Yamamoto et al., 2004

Al igual que las bacterias, las microalgas presentan fases de crecimiento (Figura 2). En la fase de adaptación no se presenta crecimiento, pero si alta actividad celular en el que la célula se adapta a las nuevas condiciones nutricionales y físicas del medio. Una vez adaptadas, las microalgas inician la reproducción, donde se presenta un crecimiento exponencial de la población, motivo por el que esta es nombrada la fase exponencial. A medida que se agotan los nutrientes el crecimiento decrece y entra en la fase estacionaria, no se observa cambio en el número de la población. En este punto las microalgas utilizan metabolitos de reserva (lípidos) hasta agotarse. Inicia la muerte celular y el número de la población decrece (Martinez, 2010).

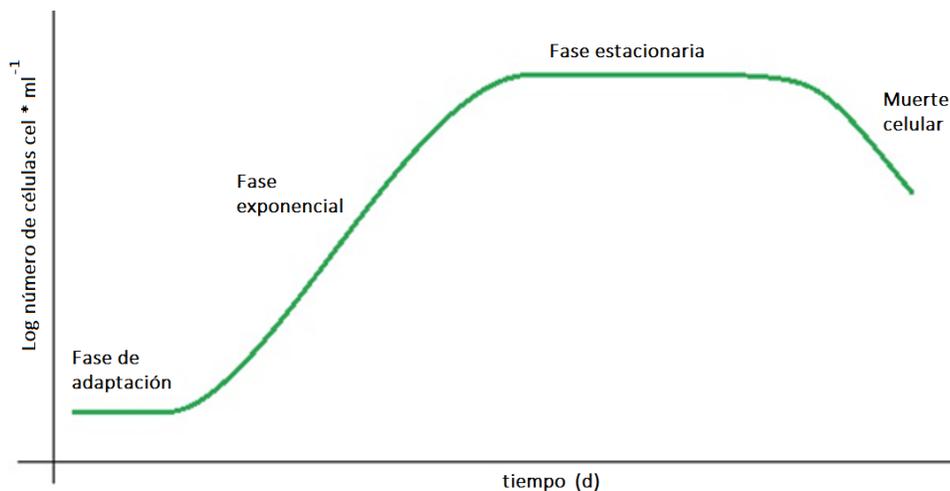


Figura 3 Curva de crecimiento celular

Tomado de San Ignacio de Loyola, 2018

4.3. Aplicaciones de las microalgas

4.3.1. Microalgas en el ambiente

Las diatomeas están compuestas por 70% de microalgas. Son consideradas el sumidero de CO₂ más grande del planeta (Chapa et al., 2018) y las mayores productoras del oxígeno en la atmósfera (Cervantes-Urieta et al., 2020). Allí los microorganismos especialmente el fitoplancton contribuye a contrarrestar las emisiones de CO₂ provenientes de actividades humanas (Cavicchioli et al., 2019).

Las microalgas pueden usarse como fertilizante orgánico en suelos agrícolas. Se ha ensayado con microalgas del género *Chlorella sp.*, la cianobacteria *Arthrospira platensis* (Spirulina), *Palmaria palmata* y *Laminaria digitata*, obtenidas de cuerpos de agua con problemas de eutrofización, para mejorar las condiciones del suelo en el cultivo de guisantes y se obtuvo un incremento en la disponibilidad de nitrógeno, carbono y fósforo de los suelos estudiados y se reflejó en los cultivos vegetales, sin la necesidad de usar fertilizantes inorgánicos (Alobwede et al., 2019a).

En lugares hostiles como el Ártico, en fumarolas de volcanes y aguas termales se encuentran microalgas y bacterias termófilas, halófilas y acidófilas que pueden ser autótrofas o heterótrofas. Estos microorganismos pueden ser utilizados para tratar emisiones de CO₂ sin la necesidad de refrigerar los gases emitidos o en concentraciones de CO₂ elevadas que aumenten la acidez del medio de cultivo, como la industria cementera. Son aplicaciones especiales donde las condiciones son extremas y no han tenido importante desarrollo pero el potencial es importante (Yunga, 2018).

4.3.2. Microalgas en la industria

Desde mediados del siglo XX se despertó el interés por el uso de las microalgas en procesos industriales, especialmente en la remoción de nitrógeno y fósforo en aguas residuales y la producción de complementos alimenticios. La crisis alimentaria ocasionada por la recesión económica del 2008 afectó principalmente a los países más pobres. Durante este periodo, se despertó el interés por las microalgas como fuente alimentaria y síntesis de biocombustibles. Sin embargo, los biocombustibles a partir de microalgas resultaron económicamente inviable, lo que llevó a un cambio en las líneas de investigación con estos microorganismos. No es claro si

actualmente con los precios del petróleo (por encima de los US\$100) y la fluctuación de los precios del mercado energético, los biocombustibles de microalgas pueden llegar a competir con los combustibles fósiles. Dependerá del desarrollo energético que se genere luego del conflicto ruso ucraniano (Torroba & Brenes, 2022).

Las microalgas tienen una composición bioquímica compleja, esto indica una cantidad de productos de alto valor como vitaminas, proteínas, carotenoides, carbohidratos, ácidos grasos como omega 3 y 6 muy demandados en industrias farmacológicas, nutrición y energía (Rivera et al., 2011; Ibañes & Guerrero 2017).

En consecuencia, las microalgas tienen aplicaciones en varias industrias. Es así como Grossmann et al., (2018) encontró contenidos alrededor del 50% de proteína en *Chlorella protothecoides* que puede ser usada como alimento. Por otro lado, Liu, Ge, Xia, Sun, y Mu (2016) lograron producir de manera eficiente hidrógeno (H₂) a partir de *Chlorella* sp. en condición fotoautótrofa y E. Ahmed, (2019) logró producir biocombustible de *Chlorella vulgaris*, confirmando el importante papel de las microalgas en la producción de energías limpias.

En la industria acuícola las microalgas son el alimento más importante debido a su carga nutricional. En conjunto, las especies de microalgas encontradas en los ecosistemas acuáticos proporcionan a peces y crustáceos una mezcla balanceada de sustancias nutritivas como proteínas, carbohidratos, lípidos y otras moléculas de interés farmacológico como carotenoides, astaxantinas, luteína, biotina, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, entre muchas otras (Alonso, 2004).

Microalgas marinas son utilizadas por la empresa *AlSkin* para la producción de productos usados en tratamientos cosméticos (AlSkin, 2022). Los géneros que se utilizan para el consumo humano son *Chlorella*, *Dunaliella* y *Arthrospira*. Los beneficios del consumo de *Chlorella* sp. está en el tratamiento de la arterioesclerosis, hipercolesterol, actividad antitumoral y úlceras gástricas. El consumo de *Dunaliella* es usado para obtener un complemento de β -caroteno y *Arthrospira* es consumida por su alto contenido de proteína y ácidos grasos como el linoleico (Santos A. et al., 2014)

En el país se han desarrollado proyectos interinstitucionales donde se ha experimentado con microalgas para la captura de CO₂, como el realizado por la Universidad EAFIT y Argos para contrarrestar las emisiones del proceso de producción de cemento (Gomez, 2019). No obstante, el género *Chlorella sp.* es muy amplio y siguen apareciendo nuevas especies a medida que avanzan las investigaciones incluyendo otros géneros de microalgas. A pesar de los múltiples estudios es necesario continuar en la búsqueda de nueva información y conocimiento, ya que una misma especie de diferentes zonas o ecosistemas bajo las mismas condiciones de crecimiento pueden tener comportamientos diferentes. En consecuencia, es importante ampliar la experiencia sobre las condiciones, parámetros, usos, especies y formas de cultivo de las microalgas.

Las microalgas son utilizadas para el tratamiento de contaminantes en las aguas residuales, puesto que consumen carbono y nitrógeno orgánico e inorgánico y fosfatos entre otros contaminantes, permitiendo reducir las concentraciones de estas moléculas. La biomasa final puede ser utilizada con otro fin y dependerá de la composición química final de estas. En Colombia se han realizado estudios donde esta biomasa es utilizada como fertilizante o tratamientos de suelos estériles (Moreno-Bayona et al., 2019).

Las aplicaciones de las microalgas son diversas y con perspectivas optimistas para diferentes usos, pero se requieren superar barreras, principalmente en la extracción de metabolitos, para conseguir rentabilidad en sus aplicaciones.

4.4. Cultivo de microalgas

Los cultivos de microalgas se pueden desarrollar de manera continua o discontinua. La diferencia entre los dos tipos de cultivo radica en el momento de realizar la cosecha de la biomasa. En los cultivos continuos la cosecha se realiza durante la fase de crecimiento exponencial. En este punto, una parte de la biomasa es retirada del cultivo mientras se suministra al medio los nutrientes consumidos. En los cultivos discontinuos la cosecha se realiza al terminar la fase exponencial debido al agotamiento de los nutrientes y se recupera toda la biomasa del cultivo. Para continuar cultivando las microalgas, se inicia un cultivo nuevo (Gaitero, 2012).

4.4.1. Biorreactores

Existen dos grupos de biorreactores para el cultivo de microalgas como se observa en la Figura 4: cerrados y abiertos. Los biorreactores abiertos son los más utilizados a escala industrial debido a su bajo costo, fácil construcción e instalación, pero requieren áreas grandes, pueden ser contaminados fácilmente con parásitos o microorganismos infecciosos. Además, requiere una fuente ilimitada de agua y se presenta dificultad en la remoción de la biomasa (Rosa et al., 2011; Iglina et al., 2022).

La agitación en estos biorreactores se realiza por medio de paletas o hélices, son construidos normalmente de hormigón, con baja profundidad para usar eficientemente la luz, no son sistemas aptos para la inyección de CO₂ y no poseen controles de temperatura. No obstante, pueden encontrarse pequeños biorreactores dentro de invernaderos para controlar la contaminación y la temperatura (Gaitero, 2012).

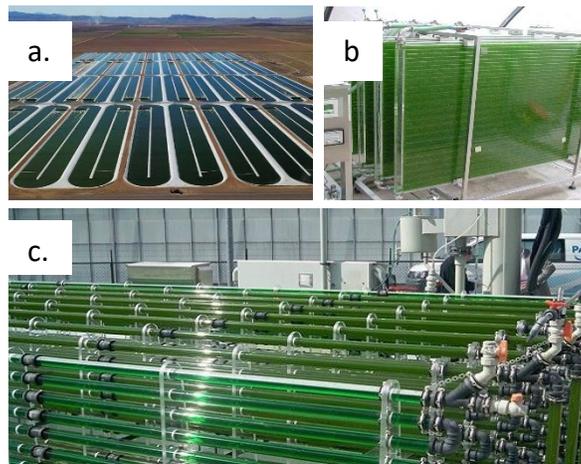


Figura 4 Biorreactores. a. Biorreactor abierto. b y c. Biorreactores cerrados

Tomado de Urbano, 2019

Los biorreactores cerrados requieren de mayor inversión. La instalación es más compleja debido al control de las variables del cultivo, al ser cerrados el riesgo de contaminación es menor y requiere de menor espacio para la instalación obteniendo mejores rendimientos en la producción de biomasa. Estos biorreactores son utilizados normalmente para el cultivo de especies de microalgas específicas con el fin de obtener biomoléculas de interés (Torres & Herrero, 1995).

Dentro de los biorreactores cerrados existen diversas formas, materiales, provistos con controles de temperatura, luz, entrada de aire enriquecido con CO₂, agitación, etc. En la Figura 4b y 4c se observan biorreactores cerrados con geometría distinta, tubulares y de placa. En los biorreactores cerrados tubulares se tiene en cuenta el diámetro del tubo, así como el grosor en los biorreactores con el fin de usar eficiente de la luz. Cuando son alimentados por luz artificial, se presta atención al control de temperatura, ya que se pueden generar aumentos hasta de 10°C por encima de la temperatura ambiente (Torres & Herrero, 1995; Hernández & Labbé, 2014).

4.4.2. Medio de cultivo.

La composición del medio de cultivo y la disponibilidad de los nutrientes es importante para el crecimiento y concentración de metabolitos en la biomasa final. Los estudios de Rushan et al., (2021), Wong (2017), Guo et al., (2015) evidencian la importancia de la disponibilidad de los nutrientes y el balance de las concentraciones de cada uno en la composición final de las microalgas

En consecuencia, los cultivos se diseñan teniendo en cuenta el género de microalga a cultivar y las moléculas de interés en la biomasa final. El medio *Bold Basal Medium* (BBM) es el medio más utilizado desde 1965 cuando fue desarrollado y se modificaron las concentraciones de los nutrientes a medida que se ampliaba el conocimiento. En la Tabla 1 se presenta las concentraciones de los nutrientes del cultivo BBM usado por Nichols & Bold (1965), para el cultivo de *Trichosarcina polymorpha*.

Las necesidades nutricionales de las microalgas están relacionadas con la presencia de macronutrientes como NO₃⁻, PO₄⁻³, SO₄⁻², K, Ca y Mg y micronutrientes como Fe, Cu, Mo, Mn, Na, Co, V, entre otros (Ortiz et al., 2016).

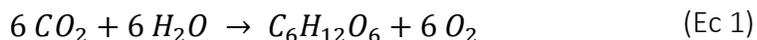
En el trabajo realizado por Ahmed (2019) se observó mayor crecimiento de biomasa y concentración de lípidos en *Chlorella vulgaris* al mantener el cultivo con adición de vitaminas (B1 y B12), frente a los cultivos que no la tuvieron. Este resultado demuestra que no solo los macronutrientes son fundamentales en el metabolismo de las microalgas, sino también la presencia de otras moléculas orgánicas como azúcares, ácidos orgánicos, acetato y glicerol, aceleran el metabolismo de estas (Plaza, 2020).

4.4.3. Fuente de carbono

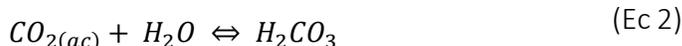
Las microalgas se clasifican según la fuente de carbono en fotoautótrofas, mixotróficas y heterótrofas. Las microalgas fotoautótrofas consumen carbono inorgánico (CO_2), el cual se encuentra en el aire y es una de las principales fuentes para las microalgas marinas (Moronta, 2016), pero puede generarse de otras fuentes como suelos carbonatados y rocas carbonáceas en los ríos (Cai et al., 2020).

Las microalgas mixotróficas pueden asimilar fuentes de carbono orgánicas e inorgánicas. Estas microalgas no necesariamente requieren de ambas fuentes, pueden vivir con una de las dos, y son las más utilizadas para la biorremediación de áreas y cuerpos de agua contaminados por su capacidad de utilizar diferentes formas de nitrógeno inorgánico, fosfato y carbono orgánico e inorgánico.

El proceso global para la fijación de carbono en el metabolismo está formado por dos fases cíclicas: fase lumínica y fase oscura. En la fase lumínica se convierte la energía solar en energía química y se produce O_2 . La energía presente en ATP y NADPH es utilizada en la fase oscura para la conversión de CO_2 en glucosa (Ec 1), y posterior formación de moléculas más complejas mediante el ciclo de *Calvin-Benson* en el cloroplasto (Maia et al., 2020).



El carbono es el macronutriente más importante en el medio de cultivo, ya que es el elemento principal de las moléculas que componen las células. El CO_2 contribuye adicionalmente en la fotosíntesis generando un amortiguador del pH en el medio de cultivo por medio de las reacciones (Ec 2).



Este equilibrio químico produce un pH entre 8.1 y 8.3 (ligeramente básico). Sin embargo, la disolución de CO_2 adicional puede sobrepasar la capacidad de amortiguamiento de este equilibrio ocasionando un descenso del pH (Deng et al., 2019). Este proceso se puede evidenciar fácilmente en el océano donde el problema del aumento de las concentraciones de CO_2 en la atmósfera genera acidificación del océano perjudicando los corales y otros organismos calcáreos (Cai et al., 2020).

Aunque las microalgas tienen la capacidad de contrarrestar los cambios de pH, consumiendo el CO_2 disuelto, la presencia de otras fuentes de H^+ (ácidos) o el exceso de CO_2 , la temperatura y salinidad pueden reducir el pH ocasionando que las moléculas HCO_3^- y CO_3^{2-} vuelvan a su forma ácida (H_2CO_3 y CO_2a) como se observa en la Figura 5. Igualmente, el cultivo de microalgas se afecta por otras variables como la concentración y especie de microalgas y la composición iónica (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

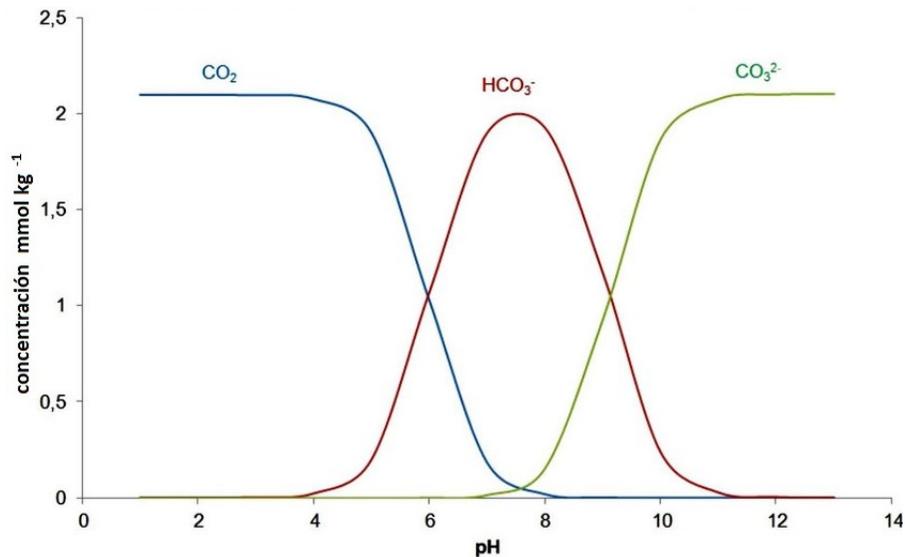


Figura 5 Concentración de las especies químicas del sistema carbonato en función del pH con concentración de CO_2 2.1 mmol.kg⁻¹

Tomado de Souza et al., 2012

En los organismos heterótrofos se utiliza carbono orgánico proveniente de moléculas orgánicas como fuente de carbono y energía para producir CO_2 mediante la respiración. El ciclo bioquímico principal es el ciclo de *Krebs* en el que convergen vías metabólicas para la síntesis de moléculas orgánicas específicas, algunas de estas vías son la glucólisis, gluconeogénesis, síntesis de

aminoácidos, síntesis de ácidos grasos, fosforilación oxidativa, entre otras. En las algas este proceso se presenta en la mitocondria (Li et al., 2022).

4.4.4. Fuente de Nitrógeno

El nitrógeno es el segundo macronutriente más importante, después del carbono, para el cultivo de microalgas. El suministro de nitrógeno se realiza por medio de la adición de nitrato, amoníaco o urea, también es posible realizarlo a través de nitrito. Sin embargo, el amonio y nitrito pueden ser tóxicos a elevadas concentraciones para ciertas especies de algas (Murcia & Parra, 2018).

Greses et al., (2022) encontró limitaciones en el crecimiento de *Chlorella* por las altas concentraciones de amonio y amoníaco, pero concluye que este género puede asimilar el 100% del nitrógeno inorgánico de efluentes de digestión anaeróbica y puede reemplazar los tratamientos de desnitrificación en las plantas de tratamiento, las cuales producen NO_x. En contraste, la limitación de nitrógeno genera una alteración del metabolismo de las microalgas ocasionando una acumulación de lípidos y reduciendo la división celular (Rubio et al., 2013). Este comportamiento puede ser usado para la producción de biocombustibles.

4.4.5. Fuente de energía

La iluminación es la fuente de energía necesaria para la síntesis de biomoléculas en el metabolismo de las microalgas. Esta iluminación tiene un límite, ya que sobrepasarlo desactiva los fotosistemas encargados de transformar la energía lumínica en energía química (Gao et al., 2022).

El nivel de iluminación está relacionado con la velocidad de las reacciones bioquímicas en el metabolismo de las microalgas. En la literatura existen modelos que intentan predecir el crecimiento de las microalgas, entre estos está el modelo tangencial hiperbólico, modelo simplificado de desaceleración y otros basados en la distribución de *Poisson* (Iglina et al., 2022)

De este modo, la energía lumínica es uno de los parámetros más importantes en el cultivo de microalgas, y se puede considerar como el factor limitante del cultivo. El control de la iluminación en el cultivo presenta mayor eficiencia en el crecimiento de la población de microalgas. Justamente, las acciones para llevar a cabo este control permitieron el diseño y construcción de

biorreactores para este trabajo (Figura 4b) que faciliten la disposición uniforme de la luz para todo el cultivo (V. Kumar et al., 2021).

A escala de laboratorio es frecuente encontrar fuentes artificiales de luz como lámparas de tubos fluorescentes. Una parte de la luz emitida por estas lámparas se pierde al no llegar al cultivo por la geometría del biorreactor y por la distancia con la lámpara (Fernandez, 2014a). Un ejemplo de este comportamiento se observa en la Figura 6, donde se puede observar zonas oscuras donde la luz no llega. De la energía que llega al cultivo cierta cantidad es reflejada, otra es absorbida (produciendo incremento de la temperatura del medio) y el resto es absorbida por las microalgas.

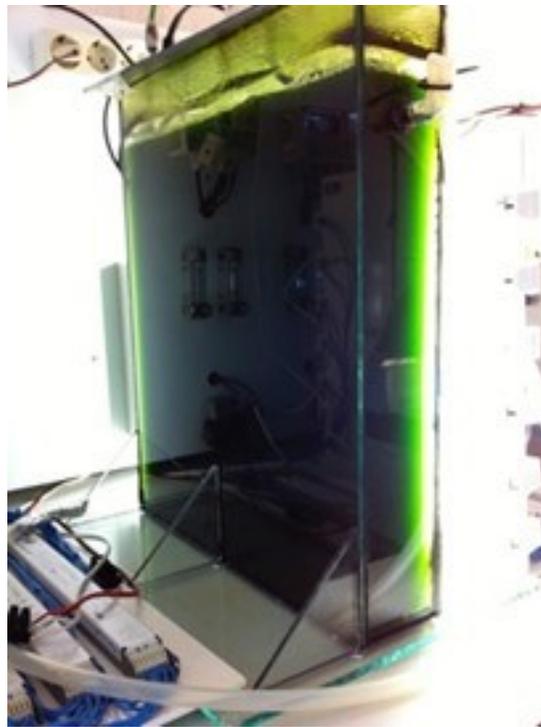


Figura 6 Radiación directa con lámparas. La falta de uniformidad de la dispersión de la luz en todo el medio de cultivo limita el crecimiento de las microalgas.

Tomado de Fernandez, 2014

4.4.6. Parámetros de cultivo

4.4.6.1. Temperatura

La temperatura es una variable importante en los biorreactores, la mayoría de las microalgas se desarrollan entre los 25 y 40°C. El crecimiento de las microalgas es limitado fuera de este rango

(Guo et al., 2015). Las microalgas termófilas tienen la capacidad de crecer en valores de temperatura más elevados. En el Parque Nacional Natural Los Nevados, Santamaría (2011) encontró algas de la clase *Chlorophyceae* y *Bacillariophyceae* en aguas termales a 56.8 °C. En contraste, Hinz et al., (2012) observaron en su estudio especies del género *Fragilariopsis sp.* en el mar de Escocia a -0.6°C. Sin embargo, pocas especies tienen la capacidad de vivir bajo estas condiciones y obviamente su uso requiere de condiciones especiales (Anzures et al., 2021).

En los estudios de Tang et al., (2011), López et al., (2019) se concluyó que la temperatura afecta la producción de biomasa y la acumulación de lípidos en las especies *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* y *Galdieria sp.* Por otro lado, Barten et al., (2021) ensayó con el género *Picochlorum sp* en un rango de temperaturas desde 30 hasta 47.5°C y encontró que en este rango las cadenas lipídicas en las microalgas eran más cortas.

En conclusión, el rango de temperatura ideal para el cultivo del género *Chlorella sp.* es (28 - 36°C) según los resultados de los estudios de Yadav et al., (2015), Duarte et al., (2016), Rushan et al., (2021). Por encima de esta temperatura, las microalgas reducen su crecimiento. Mientras que, a temperaturas más bajas, se reduce el crecimiento y cambia la composición de ácidos grasos de las membranas celulares. Por lo tanto, dependiendo de la temperatura se puede optimizar la absorción de CO₂, o buscar el desarrollo de productos especiales (Barten et al., 2021).

4.4.6.2. pH

La mayoría de las especies de microalgas crecen en ambientes básicos. Sin embargo, la disponibilidad de CO₂ disuelto decrece a elevada alcalinidad. A pH de 9 el carbono inorgánico se encuentra en los iones y HCO₃⁻ y CO₃⁻² en proporción 1:1 y poco o nada de CO₂ disuelto, mientras que a pH 6 los iones predominantes son CO₂ y HCO₃⁻. Estos últimos son los iones usados por las microalgas fotoautótrofas como fuente de carbono (Borowitzka, 2018). Adicionalmente, la tasa de difusión en el agua es 104 veces más lenta que en el aire y la tasa de conversión de HCO₃⁻ a CO₂ es lenta a pH alcalino. Estas condiciones afectan la disponibilidad de CO₂ en el medio de cultivo afectando el crecimiento de la biomasa (Colman et al., 2002).

Las microalgas en general se desarrollan en valores de pH cercanos a 7.0. En el estudio de Tang et al., (2011) con el género *Chlorella sp.* se encontró una variación del pH entre 5.3 y 9.1 adicionando

diferentes concentraciones de CO₂ al medio de cultivo. Observó que a pH menor de 6.0 las microalgas interrumpen su crecimiento. Pese a esto, estas microalgas acumularon mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que en los ensayos a pH más altos, muy diferente a lo publicado en otros estudios. En contraste, Wang et al., (2010) concluyó que para el rango de pH 6.5 – 7.0 la microalga *Chlorella vulgaris* crece mejor, pero acumula mayor cantidad de lípidos entre 7.0 – 8.5; Finalmente, concluye que para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, el mejor valor para el cultivo es de un pH 7.0.

4.4.6.3. Agitación

La agitación de los cultivos de microalgas es indispensable para mantener homogeneidad en el cultivo. Las microalgas se precipitan en medios estáticos, lo que conlleva a paralizar su crecimiento por falta de luz y nutrientes. Las microalgas deben permanecer en suspensión para garantizar la correcta absorción de nutrientes y llevar a cabo todos sus ciclos metabólicos. La agitación también evita la acumulación de oxígeno disuelto y mejora la transferencia de carbono, lo que permite acelerar el proceso de captura de CO₂ (Lim et al., 2021).

La agitación mecánica es la opción más utilizada en biorreactores abiertos y la aireación en los biorreactores cerrados. Se pueden implementar ambas opciones con el fin de disminuir los consumos de energía eléctrica en el proceso e inyectar CO₂ o CO₂ y aire. La agitación contribuye también para mantener homogéneo el cultivo, una temperatura estable y una transferencia adecuada de los gases inyectados (Rosa et al., 2011; J. Cheng et al., 2015).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la concentración de CO₂ en un cultivo mixto de microalgas bajo condiciones de laboratorio.

5.2. Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de crecimiento de un cultivo mixto de microalgas buscando la captura de CO₂.

- Determinar la concentración de CO₂ en la cual se alcanza mayor eficiencia de captura de CO₂.
- Identificar las posibilidades del uso de biomasa algal obtenida a partir de su contenido de carbono total, nitrógeno total y proteína.

6. METODOLOGÍA

6.1. Origen de la microalga

Las microalgas utilizadas en este trabajo fueron suministradas por la Dra. Aura Marina Pedroza del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). El cultivo es una mezcla de microalgas del género *Chlorella sp.* mantenidos en un reactor fototrópico (30 L) a 25°C, agitación de 100 rpm, luz artificial y en medio BBM modificado; mayor cantidad de micronutrientes (Mg, Fe, Mn, Co, Mo, Zn), menor cantidad de KH₂PO₄ y sin KOH, Cu y EDTA (Céspedes et al., 2021); y adición de glucosa (0.1 g.L⁻¹) como fuente de carbono.

6.2. Condiciones de crecimiento de cultivo

Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Aguas y Gases del Servicio Geológico Colombiano sede Bogotá a temperatura ambiente (19 ± 3°C). Se utilizó el medio de cultivo BBM modificado, (Tabla 1 Medio de cultivo BBM modificado1), preparado con agua Tipo II y esterilizado en recipientes de polietileno de alta densidad (3.8 L) en autoclave (115°C y 15 PSI) (STM-E; Market Forge)(USA).

Tabla 1 Medio de cultivo BBM modificado

Macronutriente	mg.L ⁻¹ H ₂ O	Micronutriente*	stock g.L ⁻¹ H ₂ O
KH ₂ PO ₄	105 [↓]	FeCl ₃	0.194
K ₂ HPO ₄	75	MnCl ₂	0.082
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	105 [↑]	CoCl ₂	0.16
NaNO ₃	250	Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0.008
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	25	ZnCl ₂	0.005
NaCl	25		

* 3 ml de solución stock a solución inicial

([↑]_↓) indica el incremento o reducción de la concentración original

Se utilizó un cultivo inicial de microalgas (1.5 g_{ps}.L⁻¹) para colocar una concentración inicial (0.2 g_{ps}.L⁻¹) en cada unidad experimental (1.7 L). Se ajustó el pH inicial (7.0 – 7.5) y se monitoreó la temperatura del medio (28 ± 3°C) durante la incubación. Para cada una de las diez unidades

experimentales se utilizó fuente de luz led blanca fría continua (1000 lm)(5050White; China)(Figura 7) para evaluar la captura de CO₂ y el crecimiento de las microalgas con inyección a diferentes concentraciones de CO₂. La incubación de las unidades experimentales se realizó con un agitador orbital (Advanced 15000; VWR)(USA) a 30 rpm y adición de mezcla de gases CO₂ y aire (0.57 L.min⁻¹).

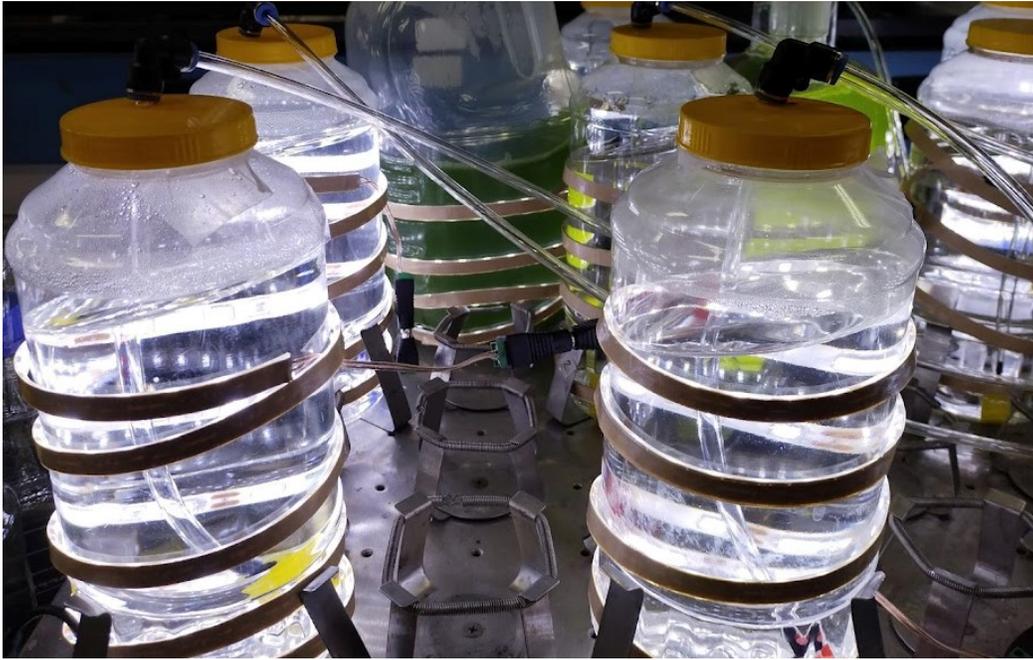


Figura 7 Montaje de las unidades experimentales (1.9 L) en medio BBM modificado e iluminación LED

6.3. Parámetros cinéticos de crecimiento

6.3.1. Velocidad específica máxima de crecimiento (μ)

Se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) (d⁻¹) por medio de la Ec 3 (Kassim & Meng, 2017).

$$\mu = \frac{(\ln X_2 - \ln X_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (Ec\ 3)$$

Donde, X_2 y X_1 son la concentración de biomasa en el tiempo t_2 y t_1 respectivamente en la fase exponencial.

6.3.2. Producción de biomasa (X)

La producción de biomasa es la cantidad de biomasa generada durante el tiempo de cultivo (g.L^{-1}) Se calculó por medio de la Ec 4.

$$X = X_t - X_0 \quad (\text{Ec } 4)$$

6.3.3. Productividad máxima de biomasa (P)

La productividad máxima de biomasa (P) es la cantidad máxima de biomasa generada en el cultivo por unidad de tiempo ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), por medio de la Ec 5.

$$P = \frac{(X_t - X_0)}{(t_x - t_0)} \quad (\text{Ec } 5)$$

Donde, X_t es la concentración de biomasa (g.L^{-1}) al terminar el periodo de tiempo t_x , X_0 es la concentración inicial (t_0) de biomasa (g.L^{-1}).

6.3.4. Tasa máxima de captura de CO_2

La tasa máxima de captura es la cantidad máxima de carbono inorgánico (CO_2) transformado en carbono orgánico por unidad de tiempo. La tasa máxima de biofijación R_{CO_2} ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) se determinó por medio de la Ec 6.

$$R_{\text{CO}_2} = C_C P \left(\frac{M_{\text{CO}_2}}{M_C} \right) \quad (\text{Ec } 6)$$

Donde C_C es la concentración de carbono total en la biomasa (%ps.), M_{CO_2} es la masa molar de CO_2 (g.mol^{-1}) y M_C masa molar de C (g.mol^{-1}), P es la productividad máxima de biomasa (Anjos et al., 2013); (Guo et al., 2015).

6.3.5. Eficiencia máxima de captura de CO_2

La eficiencia máxima de captura de CO_2 indica la cantidad de CO_2 transformado en materia orgánica en relación con el flujo de CO_2 suministrado. La eficiencia máxima de captura de CO_2 ($\%E_{\text{CO}_2}$) se calculó por medio de la Ec 7.

$$E_{\text{CO}_2} = R_{\text{CO}_2} \times \frac{V_t}{m_{id}} \times 100 \quad (\text{Ec } 7)$$

Donde, R_{CO_2} es la tasa máxima de biofijación de CO_2 ($g \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$), V_t es el volumen (L) del medio de cultivo en el biorreactor y m_{id} es la tasa de alimentación diaria de CO_2 ($g \cdot d^{-1}$). La tasa máxima de alimentación diaria (m_{id}) fue calculada por medio de la ecuación de los gases ideales (Ec 8)

$$PV = nRT \quad (Ec 8)$$

donde P es la presión (bar) de la inyección del flujo de gas al cultivo, T la temperatura del medio de cultivo ($28^\circ C$), V el volumen de CO_2 inyectado al biorreactor ($L \cdot d^{-1}$), teniendo en cuenta el porcentaje de CO_2 en cada flujo, y R la constante de los gases ideales. Así, se calculan las moles de CO_2 ($mol \cdot CO_2 \cdot d^{-1}$), para poder calcular la masa de CO_2 inyectada al cultivo ($g \cdot d^{-1}$).

6.4. Montaje del sistema de suministro de CO_2

Se utilizaron reactores (1.9 L) de tereftalato de polietileno (PET) con 1.5 L de medio de cultivo BBM modificado estéril y 230 mL de cultivo inicial ($1.5 \text{ g}_{ps} \cdot L^{-1}$). El suministro de CO_2 y aire fue realizado por tubería de poliuretano de 6 mm de diámetro y racores de acople rápido (XCPC, China). El control de flujo ($0.57 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) fue realizado con micro válvulas neumáticas manuales de 6 mm y rosca NPT $\frac{1}{2}$ ' (XCPC, China). Se utilizaron piedras difusoras para el suministro de CO_2 favoreciendo el tamaño de burbujas de tamaño pequeño en el medio de cultivo. La fuente de CO_2 (99.5%) y aire (20.93% oxígeno, balance nitrógeno) se realizó a partir de cilindros industriales (Cryogas, Colombia)(Figura 8).

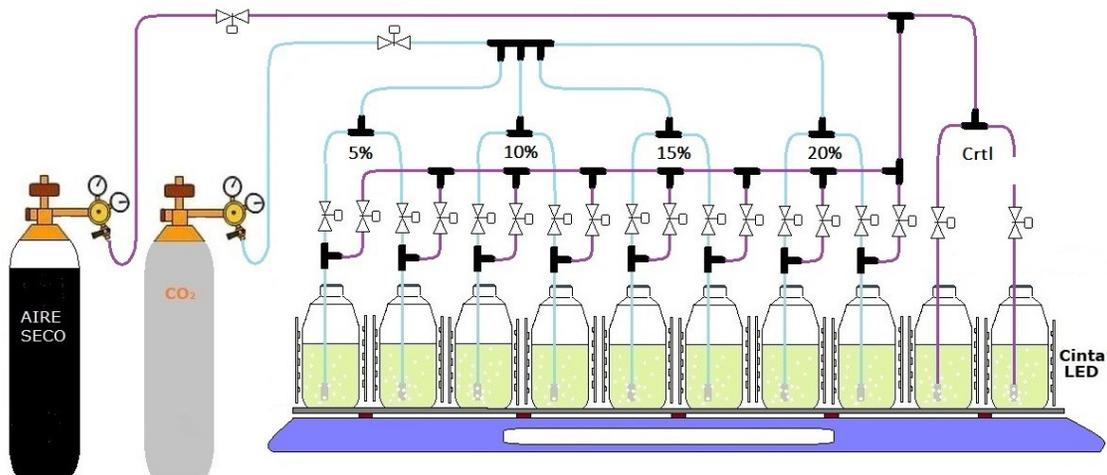


Figura 8 Montaje de cultivo de microalgas con suministro de gases en el laboratorio

6.5. Diseño experimental

Para determinar el efecto del CO₂ en el cultivo de *Chlorella sp.* bajo las condiciones establecidas en el laboratorio se utilizó un modelo unifactorial (Tabla 2) de tres niveles y se evaluaron tres concentraciones de CO₂ (0.04, 15 y 20% de CO₂)(n=2). Teniendo en cuenta las eficiencias de captura de CO₂ de este cultivo preliminar se inició un segundo cultivo evaluando cinco concentraciones de CO₂ (0.04, 5, 10, 15 y 20% de CO₂)(n=2) manteniendo las mismas condiciones del cultivo preliminar mencionadas en 6.2. Se escogieron las concentraciones de CO₂ para los cultivos con base en la concentración de CO₂ de las emisiones de equipos de combustión de fuentes fósiles, reportada en la literatura (ACCEFYN, 2003).

Tabla 2 Diseño experimental para evaluar la captura de CO₂ con microalgas del género *Chlorella sp.*

Factor. Concentración de CO ₂									
Cultivo preliminar					Cultivo final				
Niveles	1*	2	3		1*	2	3	4	5
n=2	0.04%	15%	20%		0.04%	5%	10%	15%	20%

*El nivel 1 corresponde a la adición de aire sin adición de CO₂

Los flujos de CO₂ son calculados por medio de la Ec 9 (Hulatt y Thomas, 2011).

$$U_{sg} = V_G / A \quad (Ec\ 9)$$

Donde U_{SG} es la velocidad superficial del gas (m.s⁻¹). La U_{SG} se estableció en 0.001 m.s⁻¹ que corresponde al valor más bajo entre los reportados por Hulatt y Thomas, (2011) que busca aumentar la disposición de CO₂ en el medio de cultivo. V_G es el caudal del gas (m³.s⁻¹) y A corresponde al área transversal de los biorreactores (0.0095 m²). Según estas premisas el flujo de CO₂ y aire para los biorreactores fue 0.57 L.min⁻¹. Las cantidades de CO₂ inyectado a los biorreactores según las variables definidas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3 Suministro de CO₂ a las unidades experimentales

Proporciones de CO ₂ y aire según los % de CO ₂			
CO ₂	CO ₂ L . min ⁻¹	Aire L . min ⁻¹	Caudal total L . min ⁻¹
5%	0.029	0.841	0.57
10%	0.059	0.811	0.57
15%	0.088	0.782	0.57
20%	0.118	0.752	0.57

6.6. Parámetros monitoreados durante el cultivo

6.6.1. Determinación del crecimiento

6.6.1.1. Determinación de biomasa

La determinación de biomasa en peso seco (ps.) se determinó con base en el método 2540B (APHA, 2012). Se pesó una caja petri de vidrio borosilicato ($\phi=50$ mm) junto con un filtro ($\phi=47$ mm) de $0.45 \mu\text{m}$ (HAWP04700; Millipore)(USA) en una balanza analítica (PA214 Pioneer, OHAUS)(Alemania) y se registró el peso (g). Posteriormente, se tomó 5 mL de muestra del cultivo, se filtró, utilizando el filtro pesado previamente, utilizando un equipo de filtración de polisulfona (300 ml)(WEBNA300; Nalgene)(USA). Luego, se lavó el filtrado (5 mL agua tipo II) en dos repeticiones, con el fin de eliminar las sales presentes en la muestra. Luego, se llevó a estufa (105°C) con recirculación de aire (OFA-110-8, ESCO)(Singapur) hasta peso constante. Se dejó enfriar en desecador y luego se registró el peso (g). Se calcula la biomasa ($\text{g}_{\text{ps}}\cdot\text{L}^{-1}$).

$$ST = (B - A)/V \quad (1)$$

Donde ST es la biomasa ($\text{g}_{\text{ps}}\cdot\text{L}^{-1}$) B es el peso final de la muestra (g), A el peso de la caja petri con el filtro (g) y V es el volumen de muestra (L).

6.6.1.2. Cuantificación de biomasa por densidad óptica (OD)

La biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) se estimó empleando la densidad óptica ($\text{OD}_{685\text{nm}}$) empleando un espectrofotómetro UV-VIS (EV3-172009, Thermo Scientific)(USA). La longitud de onda se determinó realizando un barrido espectral entre 400 – 700 nm del cultivo madre creciendo en fase exponencial para determinar la longitud de onda a la cual se observó la mayor absorbancia (685 nm)(Duarte et al., 2016; Plaza, 2020; (Wong, 2017). Posteriormente, se realizó la curva de calibración con 5 puntos 0.2, 0.5, 0.8, 1.2 y 1.5 ($\text{g}_{\text{ps}}\cdot\text{L}^{-1}$)($n=2$) utilizando diluciones del cultivo inicial ($1.5 \text{ g}_{\text{ps}}\cdot\text{L}^{-1}$) y determinando sus densidades ópticas. Se tuvo en cuenta que el valor de las absorbancias fuera menor que 1, ya que esta metodología sigue la ley de *Lamber Beer*.

6.6.2. Determinación de nitrato y fosfato

La determinación de nitrato y fosfato fue realizada empleando el método 4110B (APHA, 2012) utilizando en un cromatógrafo iónico (ICS-1100, DIONEX)(USA) y el software (Chromeleon 7.0, DIONEX)(USA). Se realizaron curvas de calibración con estándares certificados (MERK, Alemania)

para nitrato y fosfato (1000 mg.L^{-1}) y 7 puntos de calibración 5, 20, 50, 100, 150, 200, 500 (mg.L^{-1}). Se tomaron 7 mL del cultivo y se filtraron utilizando filtro de membrana ($\phi=47 \text{ mm}$ y $0.45 \mu\text{m}$) (HAWPO4700; Millipore)(USA). El filtrado se colocó en el vial del cromatógrafo para su posterior análisis. Los resultados de las concentraciones de fosfato y nitrato (mg.L^{-1}) se calcularon en el software.

6.6.3. Determinación de pH y temperatura

La medición de pH y temperatura del cultivo se realizó teniendo en cuenta el método 2550 B (APHA, 2012) respectivamente, con el multiparámetro (Orion Star, ThermoScientific)(USA). Antes de realizar la medición se verificó el estado del electrodo teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante. Se tomaron patrones buffer de 4.0, 7.0 y 10.0 para verificar la respuesta del electrodo, antes de realizar las mediciones de pH en las unidades experimentales. La medición de pH y temperatura se realizó directamente en los cultivos ($n=2$).

6.6.4. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína (%) en peso seco a las muestras se realizó por el método colorimétrico de *Lowry* (Peterson, 1977). Para este proceso analítico se utilizó Na_2CO_3 (2%) en NaOH (0.1 M) (MERCK, Alemania) (reactivo A), $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (1%) (MERCK, Alemania) (reactivo B), $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (2%) (Carl-Roth, Alemania) (reactivo C), Reactivo de *Lowry* (mezcla de los reactivos A, B y C [50:0.5:0.5]), reactivo de *Folin-Ciocalteu* (MERCK, Alemania) dilución acuosa (1:4), solución de albúmina de suero bovino (1 mg.L^{-1})(Cytiva, Alemania).

Se colocaron 5 mL de cultivo en un tubo en ensayo (20 mL) y se le adicionaron 5 mL de NaOH (1 N). Se agitó en agitador vórtex (444-2790, VWR)(USA) (30 s. 700 rpm) y se llevó a baño maría (93°C . 5 min). Se tomó 1 mL en tubo de vidrio (20 mL) y se adicionaron 5 mL del reactivo de *Lowry*. Se agitó en agitador vórtex a (30 s . 700 rpm). Se esperaron 10 minutos para la adición de 0.5 mL del reactivo de *Folin-Ciocalteu* y se agitó nuevamente en agitador vórtex (30 s. 700 rpm). Finalmente, se dejó reposar por 30 minutos en la oscuridad antes de ser leída en el espectrofotómetro (740 nm).

La calibración del espectrofotómetro se realizó utilizando como patrón solución de albúmina de suero bovino (1000 mg.L^{-1})(Cytiva, Alemania). Se realizó la curva con 5 puntos (50, 100, 200, 300,

400 mg.L⁻¹). Estos puntos de la curva de calibración (Figura 9) fueron tratados con el mismo procedimiento de las muestras de cultivo. Se aplicó regresión lineal de los valores de absorbancia obtenidos frente a la concentración de proteína (mg.L⁻¹). Se obtuvo la ecuación (2).

$$ABS_{740} = 0,0007X + 0.0861 \quad (2)$$

Donde *ABS* es la absorbancia medida en el espectrofotómetro (740 nm) y *X* concentración de proteína (mg.L⁻¹).

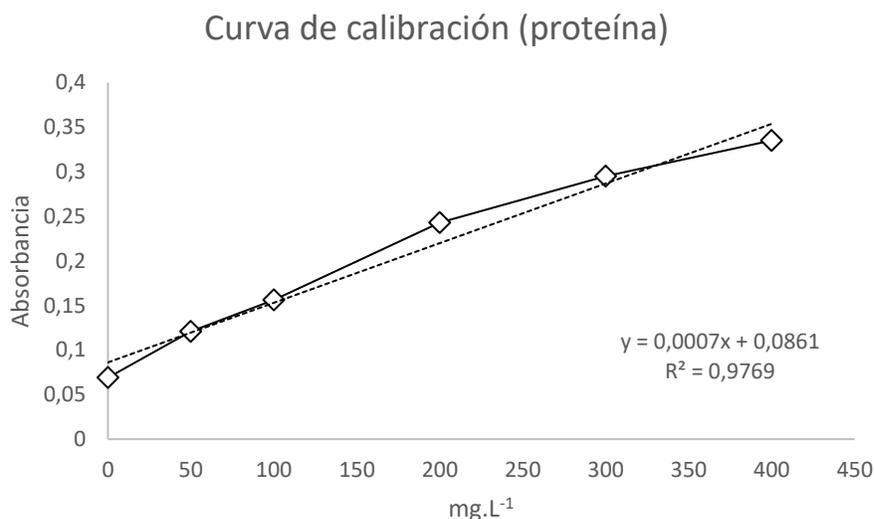


Figura 9 Curva de calibración con patrón de albúmina para determinación de proteína en suspensión de microalgas

La cuantificación final de proteína (%_{ps}) se calculó mediante la ecuación (3)

$$\% \text{ Proteína} = \frac{\frac{abs - b}{m} \times F}{a} \times 100 \quad (3)$$

Donde *abs* es la absorbancia medida en el espectrofotómetro, *b* es el intercepto de la curva de calibración (0.0861), *m* es la pendiente de la curva de calibración (0.0007), *F* es el factor de dilución ([2] dilución en la digestión) y *a* es la concentración de biomasa en peso seco (mg.L⁻¹) en la muestra inicial obtenida por OD.

6.6.5. Determinación de carbono y nitrógeno totales

La determinación de carbono total (CT) y nitrógeno total (NT) se realizó utilizando el método D5373 (ASTM,2021) en el determinador de carbono, nitrógeno e hidrógeno CHN828 (LECO,USA).

Se realizó la curva de calibración con materiales de referencia certificado EDTA (LECO,USA) en el rango 10 - 65% (CT) 2 - 10% (NT). El cultivo de cada unidad experimental se centrifugó (5000 rpm . 20 min) y se lavó (agua tipo II) en tres repeticiones. El precipitado se colocó el *beaker* (500 ml) y se secó en estufa (105°C) con recirculación de aire (OFA-110-8, ESCO)(Singapur) hasta peso constante. La biomasa seca se maceró en mortero (ágata) hasta obtener polvo homogéneo.

En seguida, se realizó la determinación de CT y NT (%_{bs}). Se pesó (700 mg) de muestra e ingresó directamente en el determinador CHN828, teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante.

6.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue realizado en el software estadístico JMP 16 (SAS Institute, USA). Se realizaron pruebas de normalidad (Shapiro) con el fin de definir el tipo de pruebas estadísticas, donde se estableció que los datos seguían una distribución normal. Luego se realizó análisis de varianza de los datos (ANOVA) donde se rechazó la hipótesis nula, donde las medias de las poblaciones eran iguales. Seguimiento de la prueba de rangos múltiples de *Tukey* con el fin de identificar cual grupo poblacional o medias eran diferentes. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con 95% de confianza ($p = 0.05$).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar el efecto del CO₂ sobre el crecimiento de las microalgas y su capacidad para fijarlo se evaluaron diferentes concentraciones de CO₂ (0.04, 5, 10, 15, 20%) en el cultivo. Se realizó un ensayo preliminar con 15 y 20% de CO₂ para determinar las mejores condiciones del ensayo y con base en los resultados se realizó un nuevo ensayo a 5, 10, 15, y 20% de CO₂. Se monitoreó el crecimiento (OD_{685nm}), concentración de NO³⁻ y PO₄³⁻, pH y temperatura en el tiempo. Los cultivos se realizaron durante 10 días en biorreactores con 1.7 L de cultivo bajo condiciones de laboratorio.

7.1. Efecto de la adición de CO₂ en el crecimiento de biomasa

Al final del cultivo preliminar se observó un mayor crecimiento de la biomasa con 20% de CO₂ (Figura 10) y el menor crecimiento a el Control de CO₂. Inicialmente, no se observaron diferencias significativas en los primeros 6 d de cultivo entre 15 y 20% de CO₂. Sin embargo, al final del estudio se observó un mayor crecimiento con 20% (1.54 g.L⁻¹) que con 15% (1.17 g.L⁻¹) de CO₂.

En el montaje final (Figura 12) se observó que la pigmentación del medio de cultivo cambiaba de acuerdo con la concentración de CO₂. No cambiaba entre las réplicas. Sin embargo, las tonalidades en el color de las concentraciones 15 y 20% en el cultivo final eran similares, esto se confirmó posteriormente en el análisis de concentración de biomasa por OD.

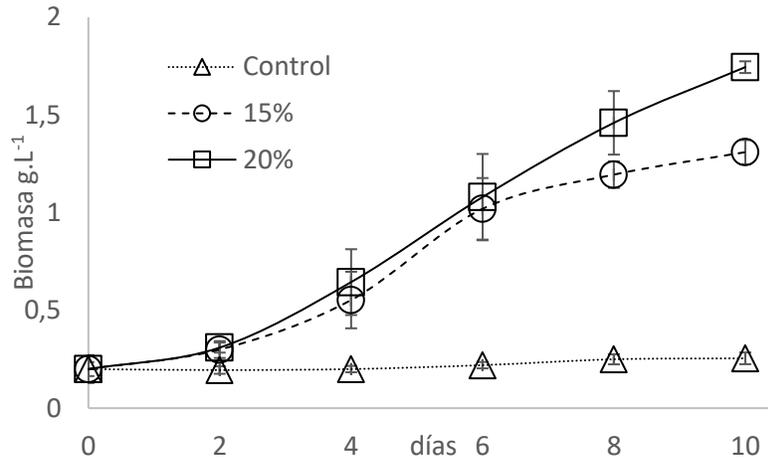


Figura 10 Crecimiento del cultivo preliminar de *Chlorella sp.* alimentada con diferentes concentraciones de CO₂.

Se observó un mayor crecimiento de las microalgas a 15% de CO₂, contrario al cultivo preliminar, también se observa mayor crecimiento de las microalgas al 5% de CO₂) en relación con el flujo de CO₂ de 10% de. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas. No se observó cambio de pigmentación en el cultivo de microalgas Control durante los días de cultivo.

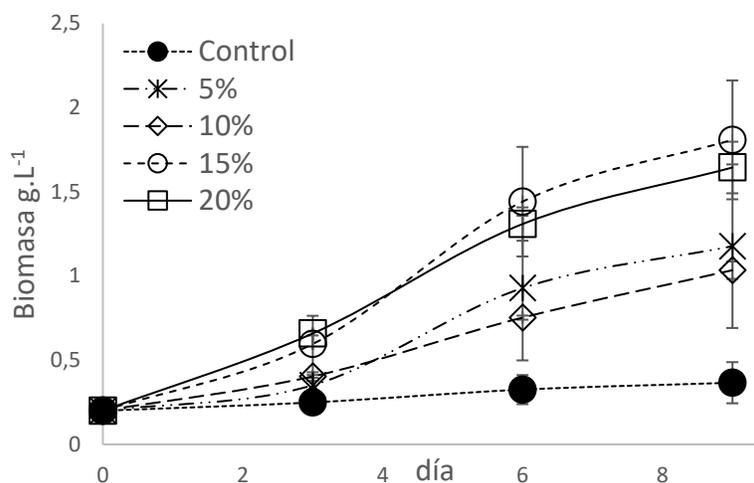


Figura 11 Crecimiento del cultivo final de *Chlorella sp.* alimentada con diferentes concentraciones de CO₂. Cultivo final

Tang et al., (2011) reportan en sus resultados de crecimiento, utilizando la especie *Chlorella pyrenoidosa*, la cantidad de biomasa en el último día (1.5 g_{ps}.L⁻¹) para el flujo de CO₂ de 10% y (1.3 g_{ps}.L⁻¹) para el flujo de CO₂ de 20%. Se puede observar que la mayor inyección de CO₂ no presenta el mayor crecimiento, al igual que lo observado en este trabajo (Figura 11).

En otro estudio realizado por Yadav et al., (2015) con *Chlorella sp.*, pero con condiciones diferentes (fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad), biorreactor ($\phi=4.5$ cm, 500 ml), pH (6.8), luz fluorescente blanca y flujo de CO₂ y aire (0.5 vvm), la cantidad de biomasa encontrada (1.9 g_{ps}.L⁻¹) al final del cultivo en el flujo de 10% de CO₂; no obstante, el mejor crecimiento se presentó en el flujo de 5% de CO₂ con (2.2 g_{ps}.L⁻¹) diferente a lo encontrado en este trabajo en el flujo 5% de CO₂ (0.98 g.L⁻¹).

Otra observación importante es el crecimiento de la biomasa con aire únicamente frente a los resultados de Yadav et al., (2015) y Tang et al., (2011). Los valores de concentración en ambos estudios son mayores que 0.8 (g.L⁻¹). Mientras en este trabajo fue menor que 0.5 (g.L⁻¹) a pesar utilizar el mismo medio de cultivo y adición de CO₂ similar (0.5 vvm).



Figura 12 Cultivo final de *Chlorella sp* (día 10)

Se observó en el día 6 una leve reducción en la velocidad de crecimiento el cultivo, no tan evidente en comparación con lo observado en otros estudios donde el pico máximo de crecimiento se encuentra entre los días 9 y 12 (Rushan et al., 2021; He et al., 2012; Tang et al., 2011; Kassim & Meng, 2017; J. Cheng et al., 2015). En contraste, el tiempo de cultivo en condiciones heterótrofas es mayor a 70 días (Plaza, 2020).

7.1.1. Producción de biomasa (X)

La cantidad de biomasa (X) en el cultivo preliminar fue significativamente mayor en el flujo de 20% de CO₂ (1.54 g_{ps}.L⁻¹) que en el de 15% de CO₂ (1.17 g_{ps}.L⁻¹)(Tabla 4). En el cultivo final el mayor crecimiento (1.61 g_{ps}.L⁻¹) se presentó en el flujo de 15% de CO₂; Sin embargo, este crecimiento no fue significativamente mayor al observado con el flujo de 20% de CO₂. Las concentraciones de 20% de CO₂ en los cultivos preliminar y final no presentaron diferencias significativas, puesto que se midió respectivamente (1.44 y 1.54 g_{ps}.L⁻¹). Diferente a lo encontrado en los flujos de 15% de CO₂ donde sí se presentaron diferencias (1.17 y 1.61 g_{ps}.L⁻¹).

La producción de biomasa se pensó como el parámetro más importante ya que a mayor cantidad de biomasa indicaba mayor cantidad de CO₂ capturado y transformado en carbono orgánico. Sin embargo, durante la inyección de CO₂ al cultivo se observaban las pequeñas burbujas de gas salir a la superficie y se consideraba que una parte del CO₂ no se disolvía en el medio de cultivo. Es así como la producción de biomasa pierde relevancia y el enfoque se centra en la eficiencia de captura de CO₂.

En la literatura consultada se afirma que la producción final de biomasa varía por muchas condiciones, como la concentración de las microalgas en el día inicial, el pH, la temperatura, la especie de microalga, la fuente de carbono, cantidad de nutrientes, etc. En estos estudios se encontraron valores de biomasa (X) por encima de 2 ($\text{g}_{\text{ps}}\cdot\text{L}^{-1}$) (Pires et al., 2012; Yadav et al., 2015; Pourjamshidian et al., 2019).

7.1.2. Productividad máxima de biomasa (P)

La productividad máxima de biomasa (P) tiene el mismo comportamiento que la producción de biomasa. En la Figura 10 y 11 se observa un punto de inflexión en la curva de crecimiento en los cultivos preliminar y final, esto indica que a partir de este punto el crecimiento de la biomasa se redujo. Esto sucede cuando uno de los nutrientes, energía lumínica, o condiciones del cultivo cambian o la suma de condiciones como la reducción de la luz (por el crecimiento de las microalgas) y el agotamiento de alguno de los nutrientes, ambas condiciones se dan en el tiempo.

La productividad máxima en el estudio de Pourjamshidian et al., (2019) encontró el mismo valor que el medido en el flujo de 15% de CO_2 de este trabajo ($0.18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Sin embargo, es importante resaltar las condiciones del cultivo en el estudio de Pourjamshidian et al. Ya que este valor fue calculado para un flujo y concentración de CO_2 diferente ($50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, 1.75%), mientras que en este trabajo el flujo de gas fue de $570 \text{ (ml}\cdot\text{min}^{-1})$. Adicionalmente, Pourjamshidian et al. indica la importancia de la disposición de nutrientes, la temperatura, el pH, la relación altura/diámetro del biorreactor, el flujo y las concentraciones de CO_2 para obtener los mejores resultados.

En otros estudios (Duarte et al., 2016; Radmann et al., 2011) se observó valores de velocidad específica de crecimiento (μ) cercanos a los calculados en este trabajo. Sin embargo, se reportaron valores de μ mayores que $0.32 \text{ (d}^{-1})$, entre $0.93 - 0.72 \text{ (d}^{-1})$ (Tang et al., 2011; Aghaalipour et al., 2020).

Tabla 4 Parámetros de crecimiento

Nivel	$\text{CO}_2 \text{ (\%, v.v}^{-1})$	$X \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1})$	$P \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1})$	$\mu \text{ (d}^{-1})$
1	Control*	$0.09^a \pm 0.01$	$0.005^a \pm 0.003$	$0.056^a \pm 0.002$
2	15%	$1.17^b \pm 0.05$	$0.111^b \pm 0.006$	$0.204^b \pm 0.005$
3	20%	$1.54^c \pm 0.03$	$0.155^c \pm 0.003$	$0.192^b \pm 0.002$
1	Control%*	$0.17^a \pm 0.12$	$0.019^a \pm 0.005$	$0.08^a \pm 0.003$

2	5%	0.98 ^b ± 0.19	0.109 ^b ± 0.021	0.32 ^b ± 0.024
3	10%	0.83 ^b ± 0.05	0.093 ^c ± 0.006	0.21 ^b ± 0.015
4	15%	1.61 ^c ± 0.16	0.179 ^d ± 0.018	0.29 ^c ± 0.001
5	20%	1.44 ^c ± 0.15	0.161 ^d ± 0.017	0.23 ^c ± 0.006

Se presenta el promedio ± desviación estándar (n=2). Letras iguales (^{a,b,c,d}) indican que no hay diferencia significativa entre los experimentos (p=0.05).

(*) corresponde a la concentración de CO₂ en el aire.

7.1.3. Tasa máxima de captura de CO₂ (R_{CO_2})

La tasa máxima de captura (R_{CO_2}) depende directamente del valor de productividad máxima de biomasa (P) y el porcentaje de carbono encontrado en la biomasa según la ecuación 6. En la literatura, es común encontrar valores de carbono en las especies *Chlorella* alrededor de 50%, valor que es tomado por varios autores para el cálculo de la tasa máxima de captura de CO₂, sin realizar la determinación instrumental del analito (Thawechai et al., 2016; Jiang et al., 2013).

Durante este estudio se encontró una cantidad de carbono total de 42.9% w.w⁻¹ en el cultivo preliminar y de 43.8% w.w⁻¹ en el cultivo final. La diferencia entre ambos cultivos no es significativa y se encuentra muy cerca a los valores reportados en la literatura (Anjos et al., 2013; Alobwede et al., 2019b).

Los resultados del análisis de tasa máxima de captura de CO₂ (R_{CO_2}) tienen el mismo comportamiento de la productividad máxima de biomasa y se observa en todas las concentraciones de CO₂ la presencia de diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5). Como se mencionó anteriormente, el flujo de 20% de CO₂ entre los cultivos preliminar (0.243 g.L⁻¹.d⁻¹) y final (0.255 g.L⁻¹.d⁻¹) presentó reproducibilidad en sus valores de R_{CO_2} . Mientras que el flujo de 15% de CO₂ en el cultivo preliminar (0.175 g.L⁻¹.d⁻¹) y el cultivo final (0.288 g.L⁻¹.d⁻¹) presentó una diferencia amplia no esperada.

Estos valores en general son comparables con los calculados en otros estudios (Tang et al., 2011; Duarte et al., 2016; Aghaalipour et al., 2020) donde los valores de la tasa de captura de CO₂ se encuentran cerca (0.2 g.L⁻¹.d⁻¹) y el carbono inferiores a 50 (%_{bs}).

7.1.4. Eficiencia de captura de CO₂ (E_{CO_2})

La eficiencia de captura de CO₂ (E_{CO_2}) durante el cultivo de las microalgas es uno de los parámetros más importantes para diseño de este proceso a nivel industrial. Es necesario

mencionar que la mayor eficiencia de captura no se obtiene a mayor producción de biomasa, por el contrario, se logró en la concentración de CO₂ de 5% (27.0%).

En el ensayo preliminar se encontró que la eficiencia de captura era más baja (8.9 y 9.2% en los crecimientos de 15 y 20% de CO₂ respectivamente) que en otros estudios en la literatura. Por ejemplo, Duarte et al., (2016) calculó una eficiencia de captura de 63.4 (%E_{CO₂}) en su mejor resultado y en el 2017 con *Chlorella fusca* encontró una eficiencia de captura de 68.6 (%E_{CO₂}) en el flujo de 10% de CO₂ (Duarte et al., 2017), utilizando un flujo aire y CO₂ de 0.05 vvm, mucho menor del calculado para este trabajo (0.33 vvm).

Las concentraciones de CO₂ evaluadas en el cultivo preliminar fueron seleccionadas por la concentración de CO₂ en los gases de chimenea de una central térmica convencional a carbón, las cuales generalmente están entre el 15 y 20% (ACCEFyN, 2003), dependerá de la calidad del combustible utilizado (J. Cheng et al., 2015). Las bajas eficiencias de captura de CO₂ logradas en el cultivo preliminar fueron el soporte para incluir dos concentraciones aún más bajas (5 y 10%). Por otra parte, para el caso de las turbinas de gas natural, estas emiten CO₂ aproximadamente al 5% (ACCEFyN, 2003).

Chiu et al., (2009) obtuvo eficiencias (47, 20, 15 y 11%) para concentraciones de CO₂ (2, 5, 10 y 15%) respectivamente, con un flujo de 0.25 (L.min⁻¹). Así, varios estudios con diferentes condiciones han encontrado múltiples valores de eficiencia; en los que cabe aclarar que los biorreactores de columna obtienen las mejores eficiencias. Por ejemplo, se encontró una eficiencia de *Chlorella vulgaris* cultivada en biorreactor de vidrio (0.03%)(botella Schott) y biorreactor tubular (42.75%), calculando el flujo mediante la ecuación $U_{sg} = V_G/A$

(y concentración de CO₂ de 10%, muy diferente entre ambos tipos de reactores (Aghaalipour et al., 2020).

Aunque en este trabajo no se estudió la diferencia entre biorreactores. Se puede concluir de la literatura, la importancia que tiene la geometría del biorreactor en la eficiencia de captura de CO₂, sin restar importancia a la influencia de otros factores como la energía lumínica, el pH, la especie de microalgas y la concentración de nutrientes. Como se mencionó anteriormente, el mejor

resultado calculado en este estudio fue en el flujo de 5% de CO₂ (27.0%) y la menor eficiencia en el flujo de 20% de CO₂ (9.6%) en el cultivo final (Tabla 5).

Tabla 5 Tasa de captura y eficiencia de CO₂

Nivel	CO ₂ (%, v.v ⁻¹)	<i>R</i> _{CO₂} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	<i>E</i> _{CO₂} (%)	%C (w.w ⁻¹)	%N (w.w ⁻¹)	% proteína
1	Control	--	--	--	--	--
2	15%	0.175 ^b ± 0.20	8.9 ^a ± 0.10	42.9 ^a ± 0.49	7.7 ^a ± 0.31	46.5 ^a ± 0.01
3	20%	0.243 ^a ± 0.33	9.2 ^a ± 0.12	42.9 ^a ± 0.57	7.8 ^a ± 0.11	49.2 ^a ± 0.01
1	Control	--	--	--	--	--
2	5%	0.176 ^a ± 0.001	27.0 ^a ± 0.08	44.1 ^a ± 0.12	6.35 ^a ± 0.01	51.3 ^a ± 0.01
3	10%	0.149 ^b ± 0.001	11.3 ^b ± 0.004	43.8 ^b ± 0.17	6.30 ^b ± 0.01	52.1 ^{ac} ± 0.01
4	15%	0.288 ^c ± 0.001	14.6 ^c ± 0.004	43.9 ^{ab} ± 1.25	6.29 ^b ± 0.02	49.8 ^b ± 0.01
5	20%	0.255 ^d ± 0.005	9.6 ^d ± 0.18	43.3 ^b ± 0.78	6.30 ^b ± 0.08	53.9 ^{bc} ± 0.01

Se presenta el promedio ± desviación estándar (n=2). Letras iguales (^{a,b,c,d}) indican que no hay diferencia significativa entre los experimentos (p>0.05).

(--) No fue posible determinar los valores por falta de muestra (bajo crecimiento de biomasa)

7.2. Remoción de nitratos y fosfatos durante el crecimiento del cultivo

En la Figura 13 y Figura 14 se observa la remoción de nitrato y fosfato en el tiempo respectivamente. En el caso del nitrato este se agota completamente, mientras que el fosfato se consumió hasta llegar a la concentración de 50 mg.L⁻¹ en los crecimientos de 5, 15 y 20% de CO₂. En el flujo de CO₂ de 10% se encontró una concentración final de nitrato de 34.6 (mg.L⁻¹) y fosfato 60.14 (mg.L⁻¹) respecto a las demás concentraciones evaluadas, fue el único flujo en el que el nitrato no se redujo considerablemente; sin embargo, en las curvas de crecimiento (Figura 11) se observó que este flujo es el menor de todos los evaluados, pero sin diferencia significativa con el crecimiento más cercano (5% de CO₂).

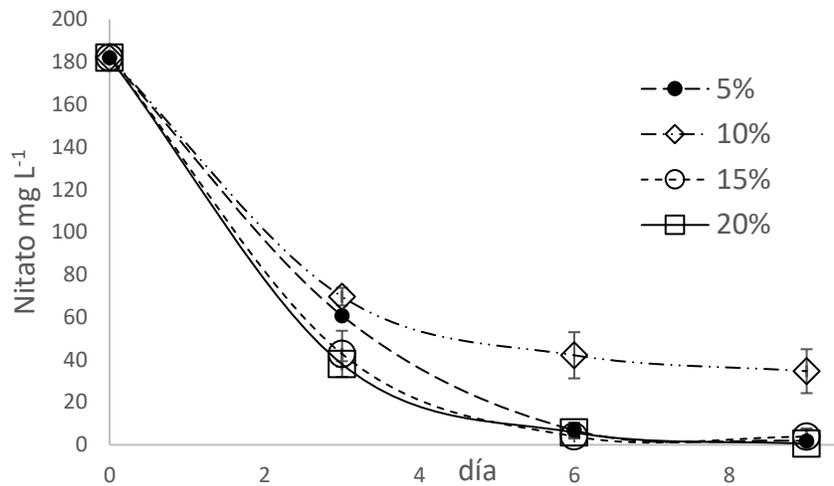


Figura 13 Consumo de nitrato en el cultivo final de *Chlorella sp.*

A pesar de no presentarse claramente una fase estacionaria, en la Figura 11 se puede concluir que el cultivo logró consumir todo el nitrato hacia el final del estudio y es posible afirmar que en los últimos días el crecimiento de las microalgas fue limitado.

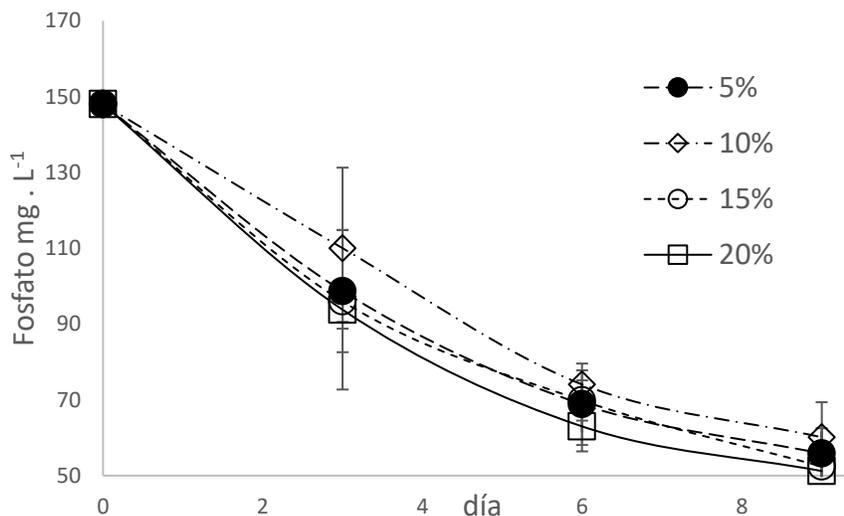


Figura 14 Consumo de fosfato en el cultivo final de *Chlorella sp.*

7.3. Monitoreo del pH y temperatura durante el crecimiento del cultivo

Al evaluar el pH del cultivo en el tiempo, se observó que no hubo variaciones significativas entre las concentraciones, exceptuando el crecimiento Control. En la Figura 15 se observa claramente cómo afecta la adición de CO₂ en el medio de cultivo en el día 0, la diferencia entre las demás concentraciones es mayor que 1 unidad de pH.

En ambos cultivos se adicionó máximo 5 ml de NaOH (6N) para ajustar el pH en el día 0, los datos presentados en la Figura 17 corresponden a valores de pH antes de la adición de NaOH. Se colocó solo esta cantidad para no alterar la composición del medio de cultivo; sin embargo, la adición no superó en ningún momento el pH 7 a pesar de la concentración del NaOH adicionado.

Por el contrario, El comportamiento del pH en los cultivos realizados por Yadav et al. el pH aumenta con el tiempo hasta alcanzar valores cercanos a 10. Mientras Tang et al. al encontró valores de pH apenas por encima de 6.0 en el día 3 de cultivo en las concentraciones de 10 y 20%, un comportamiento parecido al encontrado en este trabajo.

De otro lado, otros estudios como el de Kasiri et al., (2015) aseguran que el pH en cultivos alimentados con CO₂ se estabilizan en valores cercanos a 6.0. En este trabajo se confirma ese comportamiento y el brusco descenso del pH inmediatamente inicia la dosificación de CO₂ en el cultivo. Finalmente, el pH se mantuvo en el rango (6.0 – 7.0).

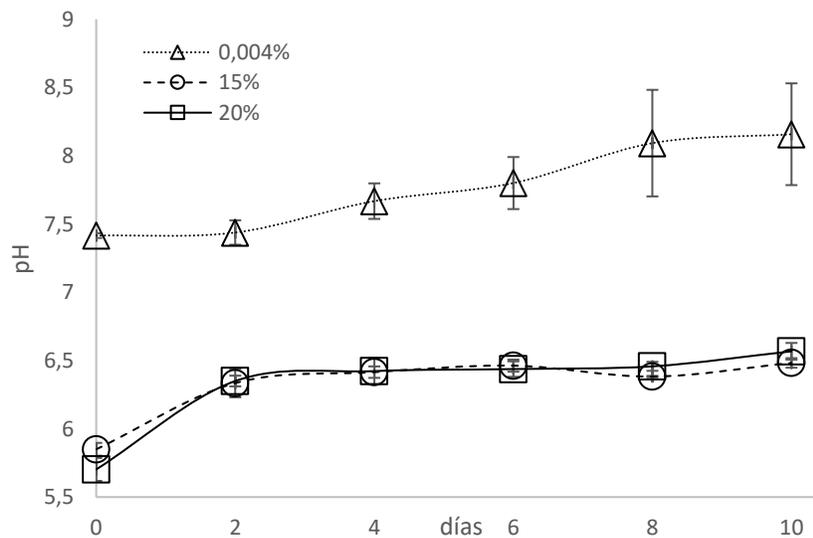


Figura 15 Comportamiento del pH en el cultivo preliminar de *Chlorella sp.*

Este comportamiento permite inferir la formación de una solución amortiguadora en el medio, que protegió el cultivo ante cambios de pH. Si se compara la desviación estándar del flujo Control con las demás concentraciones se observa mayor variación en el control y con leve aumento de pH y como se mencionó anteriormente, se observó un ligero crecimiento (0.09 g.L⁻¹) de biomasa.

En el trabajo de Wang et al., (2010) se encontró que la biomasa reduce la velocidad de crecimiento a pH menor que 6.0.

La temperatura del cultivo fue otra variable que no presentó variaciones considerables, pues su media se mantuvo alrededor de 28°C y no se observan cambios de más de 3°C como se presenta en la Figura 16, exceptuando la temperatura del día 0. En múltiples estudios (Rushan et al., 2021; Aghaalipour et al., 2020; J. Cheng et al., 2015) se asegura que la temperatura ideal para las especies *Chlorella sp.* oscila entre 25 y 30°C.

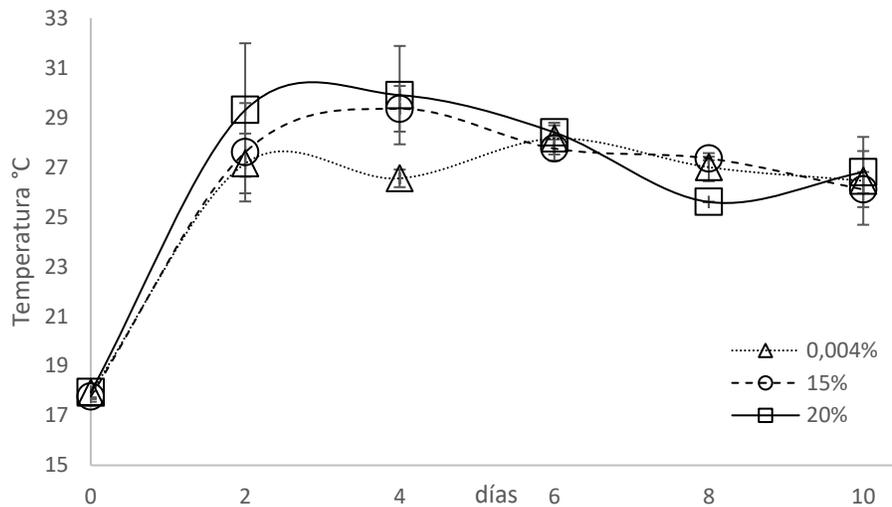


Figura 16. Comportamiento de la temperatura durante el cultivo preliminar de *Chlorella sp.*

Este comportamiento se explica por la estabilidad de la temperatura ambiente del laboratorio y la fuente de energía lumínica utilizada. Esta fue la encargada de suministrar el calor necesario al cultivo para mantener la temperatura del medio de cultivo.

7.4. Carbono total, nitrógeno total y proteína en la biomasa final

El nitrógeno presentó una diferencia mayor que el contenido de carbono; mientras que, en el primer cultivo los contenidos de nitrógeno están por encima de 7.5 (% w.w⁻¹), en el segundo cultivo no superan 6.5 (% w.w⁻¹). También se observa que en el segundo cultivo el mayor contenido de nitrógeno es el flujo de 5% de CO₂, este también fue el que mejor eficiencia de captura de carbono presentó (27.0%) y mayor contenido de proteína (53.9% w.w⁻¹). Los contenidos de carbono fueron comparables en ambos cultivos.

Los valores de proteína calculados fueron comparables con los resultados publicados por Duarte et al., (2016) donde cuantificó la proteína en 50.2 (% w.w⁻¹) en *Chlorella fusca* o Anjos et al., (2013) donde se publicaron valores cercanos a 40 (%w.w⁻¹) en *Chlorella vulgaris*. Además, se observó la relación directa de la concentración de nitrógeno total con el contenido de proteína, un comportamiento esperado debido al importante papel que desempeña el nitrógeno en la formación de aminoácidos y péptidos en las microalgas.

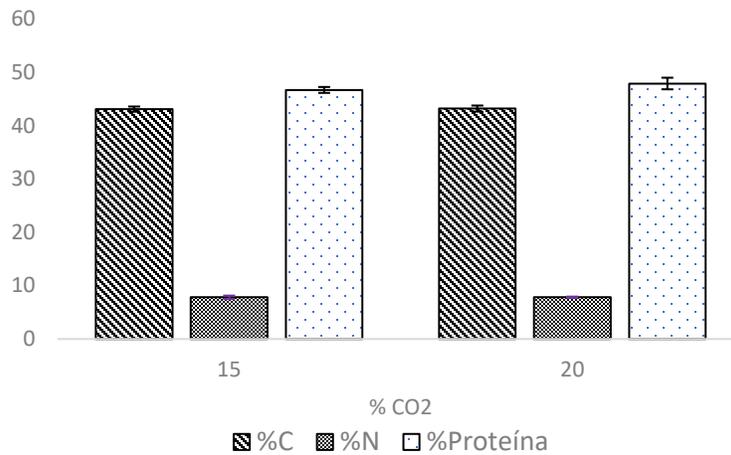


Figura 17 Concentración de proteína, CT y NT a diferentes concentraciones de CO₂ en el cultivo preliminar

En la Figura 17 y Figura 18 se observa esta relación. Se presenta un debate entre la comunidad científica con relación a los resultados (% w.w⁻¹) de nitrógeno total y proteína presente en las microalgas. Se mencionó un rango de factores de conversión para microalgas entre 2.53 y 5.77 (Janssen et al., 2017) donde el nitrógeno no proteico ocasiona resultados variables en este cálculo.

Los métodos ideales para la cuantificación de proteínas son la hidrólisis y posterior cuantificación por cromatografía líquida (HPLC) siendo un proceso extenso, costoso y poco útil si el requerimiento es analizar gran cantidad de muestras. El método *Kjeldahl* y *Dumas* para la determinación de nitrógeno total son mucho más sencillos y rápidos. Sin embargo, estos métodos tienen la desventaja de no ser específicos para nitrógeno proteico. El método de *Lowry* utilizado en este estudio para la cuantificación de proteínas presenta datos relativos ya que se pueden presentar reacciones interferentes entre sustancias reductoras y el reactivo de *Folin*, susceptible a interferencias y especies de microalgas (Janssen et al., 2017).

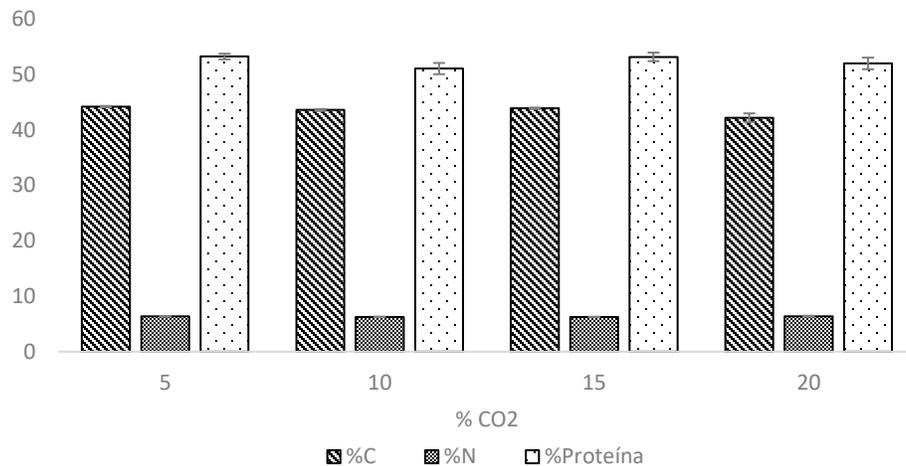


Figura 18 Concentración (%) de proteína, CT y NT a diferentes concentraciones de CO₂. Cultivo final

Las algas contienen muchos compuestos que contienen nitrógeno como los ácidos nucleicos, la clorofila, amino azúcares como la glucosamina. Estos compuestos no proteicos ocasionan incertidumbre al momento de establecer un factor de relación entre el nitrógeno total y proteína. Templeton y Laurens, (2015) estudiaron el factor a utilizar con varias microalgas y encontraron que un valor de 6.25 puede llegar a sobreestimar la cantidad de proteína en la biomasa algal mientras que 4.08 puede ser un factor conservador. También indica que cada cepa puede tener un factor específico debido a las condiciones de cultivo y la especie de microalga.

Justamente la relación (%) proteína y (%) NT encontrada en este estudio y para el cultivo preliminar ($6.20 \pm 0.22\% \text{ w.w}^{-1}$) y final ($8.0 \pm 0.26\% \text{ w.w}^{-1}$). Esto permite confirmar lo hallado por David et al., (2015) donde presenta los inconvenientes de cuantificar el nitrógeno total sin tener en cuenta la presencia de nitrógeno no proteico.

No en todos los estudios el valor de proteína encontrado en *Chlorella* se encuentra alrededor del 50%. Guo et al., (2015) en su cultivo de *Chlorella* al aire libre encontró valores de proteína menor que 10% (Figura 19). También menciona las condiciones por controlar en un cultivo de microalgas y el impacto de cada una en los resultados finales. Esto dificulta la comparación de los resultados entre los estudios.

En la Figura 19 se observan resultados (% w.w⁻¹) de CT, NT y proteína en diferentes estudios. Se confirma como puede verse afectada la composición final de las microalgas en diferentes

condiciones de cultivo. Al comparar los resultados de Anjos et al., (2013) con este trabajo se observa un comportamiento similar de las concentraciones de CT (% w.w⁻¹), con algunas diferencias en NT y proteína (% w.w⁻¹), mayor en este trabajo. En el estudio de Alobwede et al., (2019b) las concentraciones de CT y NT (% w.w⁻¹) son mayores, pero tienen el mismo comportamiento que en Anjos et al., (2013) y este trabajo. Al comparar la concentración de proteína (% w.w⁻¹) calculado por Duarte et al., (2016) con el encontrado en este trabajo, se observa que se encuentran cerca del 50%. En contraste, al observar los resultados publicados por Guo et al., (2015), se encuentra un contenido de NT mayor que el contenido de proteína, un comportamiento contradictorio si se tiene en cuenta la relación que existe entre ambos analitos.

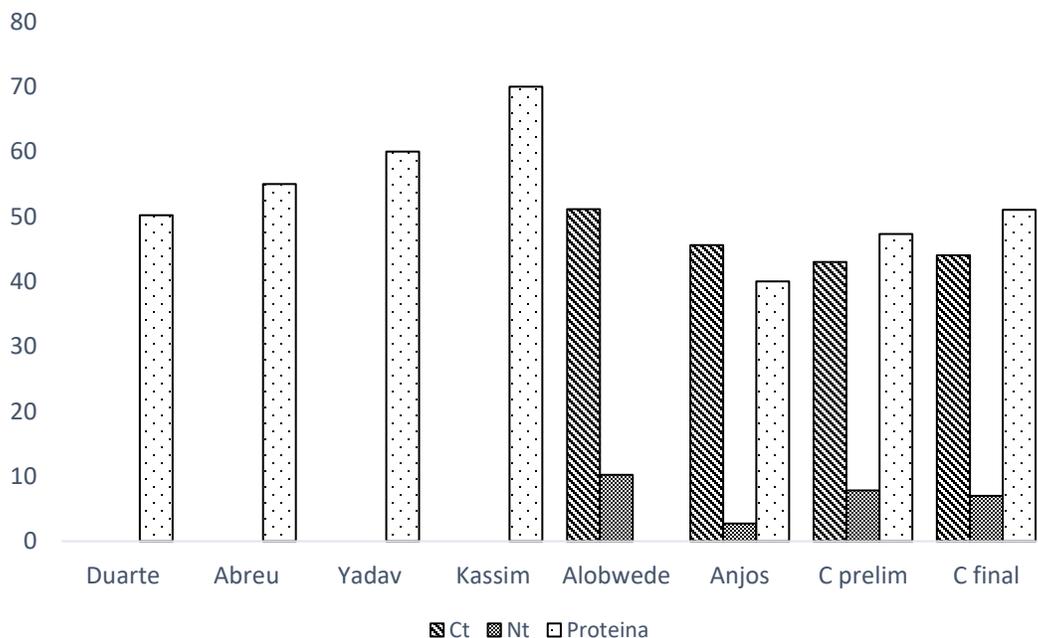


Figura 19 Comparación entre varios estudios de las concentraciones (%) de carbono total, nitrógeno total y proteína.

8. USOS DE LA BIOMASA EN LA INDUSTRIA

8.1. Microalgas como alimento

La aplicación de las microalgas en la industria alimenticia es muy utilizada por el valor de proteína, carbohidratos y lípidos como omega 3 y 6. En el mercado se encuentra suplementos alimenticios con *Chlorella* y *Espirulina*. Sin embargo, las microalgas tienen un papel mayor que solo un suplemento. Ya que por su digestibilidad son usadas en productos como galletas, panes, ensaladas

y otros productos alimenticios (Bianco et al., 2022). Además, son utilizadas para tratamientos medicinales (Figura 20) (Acquah et al., 2020).

Las microalgas también son utilizadas como alimento animal. Muy utilizadas en la industria acuícola y como alimento de animales de granja. Cerca del 30% del alimento de animales proviene de microalgas. Además, posee mejores propiedades nutritivas (Tabla 6) que los vegetales y otros alimentos animales. También su producción tiene un menor costo ambiental, menor consumo de agua y suelo. Esto quiere decir, las microalgas contribuyen con el adecuado uso del suelo al no depender de grandes extensiones para su producción (Tabla 9) y contribuye con las políticas de economía circular planteadas en las reuniones de COP (Alobwede et al., 2019a; Kumar et al., 2021).

Tabla 6 Contenidos de proteínas en alimentos de origen animal y vegetal (Zanin, 2022)

Alimentos	ANIMAL		Alimentos	VEGETAL	
	Proteína (g) animal por 100 g	Energía (calorías) por 100 g		Proteína (g) animal por 100 g	Energía (calorías) por 100 g
Carne de pollo	32.8	148	Habas	26.1	341
Bacalao salado crudo	29.0	136	Cacahuete o maní	25.4	589
Carne de vaca	26.4	163	Almendras	21.6	643
Quesos en general	26.0	316	Pistachos	21.4	568
Atún fresco crudo	25.7	118	Semillas de ajonjolí	21.2	584
Jamón	25.0	215	Garbanzo	21.2	355
Carne de puerco (lomo)	22.2	131	Nueces	16.7	699
Carne de codorniz	22.1	119	Nuez de Brasil	14.5	643
Carne de conejo	20.3	117	Semillas de linaza	14.1	495
Pescados en general	19.2	109	Soya	12.5	140
Camarones	17.6	77	Quinoa	12.0	335
Huevo	13.0	149	Trigo sarraceno	11.0	366
Yogur	4.1	54	Frijoles blancos cocidos	9.7	139
Leche	3.3	47	Lentejas	9.1	108

Sin duda, las microalgas contienen mayor contenido de proteína que cualquier otra fuente. Sin embargo, no escapa al problema alergénico causada por algunas de estas proteínas a los humanos. En la Unión Europea se han listado 13 alimentos alergénicos de preocupación. Entre estos se incluyen huevos, pescado, leche, cacahuates, soja, trigo, nuez, mariscos, apio, mostaza, lupino y crustáceos. Varios estudios se han centrado en estudiar las proteínas causales de alergenicidad

(European Parliament, Council of the European Union, 2011; Monaci et al., 2018; Hoffmann et al., 2017; Montowska & Fornal, 2018).

Las microalgas por hacer parte del primer eslabón de la cadena alimenticia y alimento primario en acuicultura comparten algunas de las proteínas alergénicas. Por ejemplo, la fructosa bifosfato aldolasa en *Chlorella*, encontrada también en proteínas de pescados y crustáceos comestibles. Es importante mencionar que son varias las proteínas marcadas como potenciales alergénicas y se requieren estudios clínicos específicos para determinar la alergenicidad de las microalgas (Bianco et al., 2022).

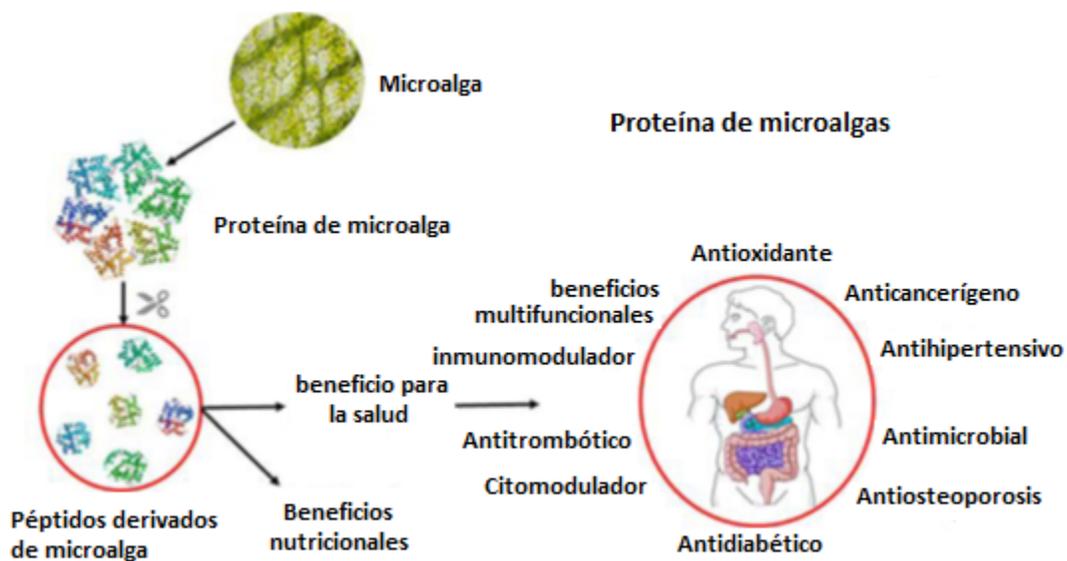


Figura 20 Beneficios de las proteínas y péptidos de microalgas

Tomado de Acquah et al., 2020

La sensación de utilizar microalgas provenientes de cultivos alimentados con emisiones de chimeneas como incineradores, hornos y calderas, como alimento causa incertidumbre por los contaminantes que pueden existir en el combustible. Dentro de estos contaminantes se puede incluir metales pesados como el mercurio y plomo o elementos cancerígenos como el arsénico.

Tabla 7 Aplicación industrial de las microalgas según biomoléculas que contienen (De Jesus Raposo et al., 2013; Priyadarshani & Rath, 2012)

Grupo / Producto	Aplicación	Biomoléculas	Especie de microalga
------------------	------------	--------------	----------------------

Pigmentos y carotenoides	Cosméticos, industria alimentaria y pinturas	β -carotenos Astaxantina, Luteína, cantaxantina	<i>Dunaliella salina</i> <i>Nannochloropsis gaditana</i> <i>Haematococcus pluvialis</i> <i>Chlorella vulgaris</i>
Ácidos grasos poliinsaturados	Aditivos alimenticios	Ácido eicosapentanoico, Ω -3, ácido docosaheptanoico Ácido araquidónico ácido docosaheptanoico Ácido linoleico	<i>Chlorella minutissima</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Porphyridium cruentum</i> <i>Parietochlorisincise</i> <i>Porphyridium cruentum</i> <i>Schizochytrium sp.</i> <i>Arthrospira, Porphyridium</i>
Vitaminas	Nutrición	Biotina Vitamina C Vitamina B12 Vitamina D	<i>Euglena gracilis</i> <i>Prototheca moriformis</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Cylindrospermum sp.</i> <i>Tolyphotrix tenuis</i> <i>Spirulina platensis</i> <i>Chlorella sp</i> <i>Arthrospira platensis</i>
Esteroides	Nutrición	Brassicasterol, Estigmasterol	<i>I. Galbana, Chaetoceros, Skeletonema, P lutheri</i>
Polisacáridos	Farmacéuticos	β -glucanos, homogalactano, espirulina, (1,4) D-glucano	<i>Chlorella vulgaris,</i> <i>Arthrospira platensis,</i> <i>Gyrodinium impudicum,</i> <i>Porphyridium cruentum,</i> <i>Dunaliella tertiolecta</i>
Enzimas	Nutrición y farmacéuticos	Anhidrasa carbónica Enzima superóxido dismutasa	<i>I. galbana, Amphidinium carterae</i> <i>Prorocentrum minimum.</i> <i>P. tricornutum, Porphyridium,</i> <i>Anabaena, Synechococcus.</i>

En contraste, un estudio realizado en 2008 donde se utilizó gases de un incinerador de residuos municipales como fuente inorgánica de carbono para la producción de *Chlorella vulgaris* observó mayor crecimiento del cultivo con esta fuente de carbono que con una fuente control de CO₂ puro. También encontró una leve concentración de mercurio en la biomasa final. Posteriormente con un filtro de carbón activado, la biomasa cumplió con la legislación alimentaria siendo apta para consumo humano (Douskova et al., 2009).

Las microalgas tienen gran potencial como materia prima para otros bioproductos. Ruiz et al., (2016) realizaron un análisis técnico económico para la producción de microalgas (excluidos los

productos de biorefinación) y estimaron el costo (3.4 €.Kg⁻¹) y una posible reducción en los próximos 10 años (0.5 €.Kg⁻¹) para el mercado español.

8.2. Microalgas como fertilizantes

En este trabajo se encontró en la biomasa final una cantidad de nitrógeno total alrededor del 7%_{bs} y carbono total cercano a 44%_{bs}. Estas cantidades de nitrógeno y carbono corresponde a carbono y nitrógeno orgánico disponible para la recuperación de los niveles adecuados de estos nutrientes en el suelo, necesarios para el crecimiento de las plantas.

Las microalgas han sido estudiadas para ser utilizadas como fertilizantes en cultivos de alimentos principalmente, pero también para recuperación de suelos afectados por erosión y monocultivos, los resultados en todos los casos son positivos. También, en conjunto con otros microorganismos o con biopolímeros, como agentes retenedores de agua, para potencializar su propiedad de reparación de en los suelos (Plaza, 2020; Khodadadi Dehkordi y Shamsnia, 2020; Umamaheswari y Shanthakumar, 2021; Kumar et al., 2021; Alobwede et al., 2019b).

En la actualidad los costos de los alimentos elevaron sus precios a nivel mundial debido al conflicto en el este de Europa de donde provienen la mayor cantidad de fertilizantes utilizados en el mundo (Bloomberg, 2022). Así, Los pequeños agricultores están contemplando los fertilizantes orgánicos como la ayuda necesaria para sus cultivos (El Economista, 2022) donde los fertilizantes de microalgas pueden jugar un papel importante.

su aplicación para el tratamiento de suelos agotados por monocultivos o suelos erosionados permite su recuperación y uso agrícola.

En muchos cuerpos de agua contaminados por la industria alimenticia, escorrentías de cultivos fertilizados con agentes inorgánicos, entre otros, se presenta eutrofización a causa de las elevadas concentraciones de nitratos y fosfatos. Esto causa el crecimiento descontrolado de microalgas que afectan el balance natural de estos ecosistemas. Alobwede et al., (2019a) utilizó estas algas para devolver los nutrientes a los suelos en un modelo circular con el fin de aprovechar los nutrientes de las microalgas nuevamente en los cultivos.

En este estudio se encontraron que luego de las aplicaciones (4 g.Kg⁻¹) de microalgas, entre las que estaban *Chlorella* y la cianobacteria *Arthrospira platensis* (*Spirulina*), se recuperaron los

niveles de amonio, nitratos, fosfatos en el suelo. Lo que confirmó su potencial para reciclar nitrógeno y otros minerales aumentando el rendimiento de los cultivos.

8.3. Biorrefinerías a partir de microalgas

A pesar de la volatilidad de los precios de los hidrocarburos y altos precios de producción de biodiesel de microalgas, se sigue estudiando en este campo pensando en el cambio de la industria por los combustibles limpios. Las microalgas pueden llegar a contener dependiendo de la especie hasta un 77% de lípidos. Donde los ésteres de ácidos grasos son los más importantes para la producción de biodiesel (Tabla 8). En este contexto y con el fin de reducir los costos por nutrientes para los cultivos, los estudios se han enfocado en el tratamiento de aguas residuales donde los niveles de nitratos y fosfatos favorezcan el crecimiento de las microalgas (Sydney et al., 2011).

Tabla 8 Contenido lipídico de microalgas (Ferreira Mota et al., 2022)

Especies de microalgas	Contenido de aceite por % de materia seca	Especies de microalgas	Contenido de aceite por % de materia seca
Botryococcus sp.	25–90	Monallanthus salina	>20
Chlorella protothecoides	23–55	Nanochloris sp.	20–35
Chlorella sp.	28–32	Nanocloropsis sp.	21–68
Chlorella sorokiriana	19–22	Neochloris oleoabundans	35–54
Chlorella vulgaris	5–58	Nitzschia sp.	16–47
Cylindrotheca cohnii	20	Phaeodactylum tricornutum	18–57
Cylindrotheca sp.	16–37	Porphyridium cruentum	9–18.8
Dunaliella primolecta	23	Scenedesmus oblicuo	11–55
Dunaliella salina	14–20	Scenedesmus sp.	19–22
Dunaliella tertiolecta	16.-71	Schizochytrium sp.	50–77
Euglena gracilis	14–20	Espirulina máxima	4–9
Isochrysis sp.	25–33	Spirulina platensis	4–16,6

El agua de mar también se ha contemplado para usarse como medio de cultivo de microalgas con fines energéticos. Se encontró la viabilidad de usar esta fuente sin necesidad de utilizar nutrientes. El ahorro en nutrientes es de 90% excepto el fosfato y entre un 55 a 84% si es reciclada el agua

después de la cosecha. Para la producción de un Kg de biodiesel se consume agua (3726 Kg) sin reciclaje, nitrógeno (0.33 Kg) y fosfato (0.71 Kg)(Yang et al., 2011).

El uso del suelo para el cultivo de plantas oleosas para la producción de biodiesel es alto en comparación con las microalgas. El maíz requiere (66 m² área.kg biodiesel⁻¹.año⁻¹) y solo tiene (44 %_{bs}.) de aceite. Mientras que las microalgas de alto contenido de aceite (hasta 70% w.w⁻¹) solo requieren (0.1 m².kg biodiesel⁻¹.año⁻¹). Otras plantas son mejores productoras que el maíz como la palma de aceite. Sin embargo, no es comparable con la eficiencia en el bajo uso del suelo de las microalgas.

Tabla 9 Comparación entre microalgas y otras fuentes de aceite para la producción de biodiesel (Ferreira et al, 2022).

Fuente de Aceite	% del contenido de aceite en materia seca	Producción de aceite (L aceite Ha-1 año -1)	Uso de suelo (m ² kg biodiesel ⁻¹ año ⁻¹)	Productividad de Biodiesel (kg biodiesel ⁻¹ año ⁻¹)
Maíz	44	172	66	152
Cáñamo	33	363	31	321
Maíz	18	636	18	562
Jatrofa	28	741	15	656
Camelina	42	915	12	809
Canola	41	974	12	862
Girasol	40	1070	11	946
Ricino	48	1307	9	1156
Aceite de palma	36	5366	2	4747
Microalga (low oil content)	30	58.7	0.2	51.927
Microalga (medium oil content)	50	97.8	0.1	86.515
Microalga (high oil content)	70	136.9	0.1	12.11

La eficiencia fotosintética de las microalgas es la mejor opción para la producción de biocombustibles en comparación con plantas como canola, soja o girasol. Además, la facilidad de crecer en múltiples condiciones y tipos de agua la convierten en una excelente opción para reducir costos ambientales. También, se estudió el comportamiento de los motores con este tipo de combustibles y a pesar de los inconvenientes mecánicos que se presentan los ingenieros tuvieron buenos resultados (Ferreira et al., 2022).

9. CONCLUSIONES

- Se identificaron y seleccionaron las condiciones de cultivo con base en la literatura científica. Las condiciones seleccionadas fueron: medio de cultivo MMB modificado, concentración inicial de biomasa de 0.2 g.L⁻¹, pH entre 5.0 y 7.0, temperatura entre 25-

30°C, 30 rpm de agitación y 1,000 Lm por cada unidad experimental. Se observó crecimiento fotoautotrófico de las microalgas con la captura del CO₂ alimentado al cultivo.

- Se logró cultivar las algas con suministro continuo de luz buscando su utilización en fuentes emisoras continuas (24 h x 7 d) de CO₂.
- La mayor eficiencia (27%) en la remoción de CO₂ se observó a la menor concentración (5%) de CO₂ suministrada. Esto indicaría que se requieren cultivos de mayor volumen para lograr capturas similares a las reportadas en la literatura (60%) bajo las condiciones evaluadas en este estudio.
- Se encontró que la cantidad de proteína (~50% w.w⁻¹) en la biomasa del cultivo es similar a la reportada en la literatura. Esto permitiría utilizarla como alimento, complemento suplemento dietario o fertilizante para suelos agrícolas.
- Las microalgas pueden capturar el CO₂, generado en la industria, con una buena eficiencia en la remoción (27%) y una buena producción de biomasa (1.6 g.L⁻¹). De igual forma la biomasa puede ser utilizada para múltiples usos como: alimentos, fertilizantes, fitofármacos, biocombustibles, y mitigando el efecto de los GEI, de las industrias donde se implemente.
- Desde el punto de vista de la economía circular la implementación de tecnologías con microalgas es una muy buena opción por la variedad de usos que pueden tener para remediar problemas de contaminación de aire, agua y suelo; sumado a los beneficios finales de los subproductos. También es posible incluir en la ecuación económica la generación de bonos de carbono, que dependen del uso final de las microalgas.

10. RECOMENDACIONES

- Es muy importante el control de los flujos de gas hacia los biorreactores, esto permite tener resultados comparables con otros estudios y dentro de las mismas unidades experimentales (duplicados de cultivo).
- La medición de otras variables como el oxígeno disuelto en el cultivo es importante para hacer seguimiento al metabolismo de los cultivos.

- A pesar de encontrar en otros estudios volúmenes de las unidades experimentales menores a 1 L, es preferible siempre utilizar grandes volúmenes con el fin de poder obtener muestreos seguidos sin necesidad de alterar el cultivo por la pérdida de volumen.
- Cuantificar los lípidos y carbohidratos permite tener más información sobre el crecimiento del cultivo y permite ampliar el campo de uso de las microalgas en la industria, por falta de recursos estas actividades no fue posible desarrollarlas.
- Con el fin de implementar en procesos con emisiones de gases GEI es importante adicionar junto con el CO₂ los demás contaminantes SO_x, NO_x y cenizas volantes que están presentes en estos flujos de gases para tener un mejor conocimiento del comportamiento de estos.
- Si las microalgas se pretenden utilizar para la industria alimenticia, es importante realizar ensayos más específicos, dependiendo de los gases que se usen, incluyendo metales pesados y moléculas orgánicas perjudiciales con el fin de conocer los riesgos en la ingesta de estas sustancias.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCEFyN. (2003). Factores de emisión de los combustibles colombianos informe final. *UPME*.
- Acquah, C., Tibbetts, S. M., Pan, S., & Udenigwe, C. (2020). Nutritional quality and bioactive properties of proteins and peptides from microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818536-0.00019-1>
- Aghaalipour, E., Akbulut, A., & Güllü, G. (2020). Carbon dioxide capture with microalgae species in continuous gas-supplied closed cultivation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 163(July), 107741. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107741>
- Ahmed, E. (2019). Evaluación de las condiciones experimentales básicas para la producción de biomasa a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*. *Afinidad*, 76(585), 63–69.
- Alobwede, E., Leake, J. R., & Pandhal, J. (2019a). Circular economy fertilization: Testing micro and macro algal species as soil improvers and nutrient sources for crop production in greenhouse and field conditions. *Geoderma*, 334(March 2018), 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.07.049>
- Alobwede, E., Leake, J. R., & Pandhal, J. (2019b). Circular economy fertilization: Testing micro and macro algal species as soil improvers and nutrient sources for crop production in greenhouse and field conditions. *Geoderma*, 334(July 2018), 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.07.049>

- Alonso, R. (2004). El fitoplacton en la camaronicultura y larvicultura. Importancia de un buen manejo. *UNAM*, 57.
- AlSkin. (2022). *Laboratorio AlSkin - Alskin Cosmetics*. LifeStile. <https://alskincosmetics.com/sobre-nosotros/laboratorio-alskin/>
- Anjos, M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., & Dragone, G. (2013). Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 139, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.032>
- Anzures, M., Gaytán, M., & Cuna, E. (2021). *Algas extremófilas: estrategias de supervivencia y uso potencial*. 25(2), 9–21.
- APHA, AWWA, & WEF. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. In *Public Health: Vol. 22nd Editi*. <https://doi.org/10.2105/AJPH.51.6.940-a>
- Barten, R., Djohan, Y., Evers, W., Wijffels, R., & Barbosa, M. (2021). Towards industrial production of microalgae without temperature control: The effect of diel temperature fluctuations on microalgal physiology. *Journal of Biotechnology*, 336(June), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.06.017>
- Bayoud, A. (2021). *China sufre la peor escasez de energía de su historia reciente*. France24. <https://www.france24.com/es/asia-pacífico/20211001-china-escasez-energia-cortes-carbon>
- Bianco, M., Ventura, G., Calvano, C. D., Losito, I., & Cataldi, T. R. I. (2022). A new paradigm to search for allergenic proteins in novel foods by integrating proteomics analysis and in silico sequence homology prediction: Focus on spirulina and chlorella microalgae. *Talanta*, 240(December 2021), 123188. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123188>
- Bloomberg. (2022). *Cómo la crisis de Ucrania amenaza con subir más los costos de alimentos*. La República. <https://www.larepublica.co/especiales/crisis-en-ucrania/como-la-crisis-de-ucrania-amenaza-con-aumentar-aun-mas-costos-de-alimentos-3308443>
- Borowitzka, M. A. (2018). Biology of Microalgae. In *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 23–72). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>
- Cagatay, G., & Erkul, N. (2021). *Un informe concluye que las emisiones globales de carbono se acercan a los niveles pre pandémicos*. AA.Com. <https://www.aa.com.tr/es/mundo/un-informe-concluye-que-las-emisiones-globales-de-carbono-se-acercan-a-los-niveles-prepandemicos-/2411894>
- Cai, W. J., Xu, Y. Y., Feely, R. A., Wanninkhof, R., Jönsson, B., Alin, S. R., Barbero, L., Cross, J. N., Azetsu-Scott, K., Fassbender, A. J., Carter, B. R., Jiang, L. Q., Pepin, P., Chen, B., Hussain, N., Reimer, J. J., Xue, L., Salisbury, J. E., Hernández-Ayón, J. M., ... Gledhill, D. K. (2020). Controls

- on surface water carbonate chemistry along North American ocean margins. *Nature Communications*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16530-z>
- Cavicchioli, R., Ripple, W. J., Timmis, K. N., Azam, F., Bakken, L. R., Baylis, M., Behrenfeld, M. J., Boetius, A., Boyd, P. W., Classen, A. T., Crowther, T. W., Danovaro, R., Foreman, C. M., Huisman, J., Hutchins, D. A., Jansson, J. K., Karl, D. M., Koskella, B., Mark Welch, D. B., ... Webster, N. S. (2019). Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 17(9), 569–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>
- Cervantes-Urieta, V. A., Pérez-Castro, D., Galeana-Parra, M. A., Ramírez-Fuentes, E., & Trujillo-Tapia, M. N. (2020). Cultivation and biochemical composition of marine diatoms (Bacillariophyta) of santa lucía bay, acapulco, mexico. *Gayana - Botanica*, 77(1), 11–22. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432020000100011>
- Céspedes Bernal, D. N., Mateus Maldonado, J. F., Rengel Bustamante, J. A., Quintero Duque, M. C., Rivera Hoyos, C. M., Poutou Piñales, R. A., Díaz Ariza, L. A., Castillo Carvajal, L. C., Páez Morales, A. I., & Pedroza Rodríguez, A. M. (2021). Non-domestic wastewater treatment with fungal/bacterial consortium followed by *Chlorella* sp., and thermal conversion of the generated sludge. *3 Biotech*, 11(5). <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02780-1>
- Chapa-Balcorta, C., Sosa-Ávalos, R., Hernández-Ayón, J. M., & Espinosa-Carreón, T. L. (2018). Base de datos sobre carbono inorgánico disuelto y flujos de carbono océano-atmósfera en ecosistemas marinos de México. *Elementos Para Políticas Públicas*, 2(3), 186–199.
- Cheng, H., Song, H., Toan, S., Wang, B., Gasem, K. A. M., Fan, M., & Cheng, F. (2021). Experimental investigation of CO₂ adsorption and desorption on multi-type amines loaded HZSM-5 zeolites. *Chemical Engineering Journal*, 406(March 2020), 126882. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126882>
- Cheng, J., Yang, Z., Huang, Y., Huang, L., Hu, L., Xu, D., Zhou, J., & Cen, K. (2015). Improving growth rate of microalgae in a 1191m² raceway pond to fix CO₂ from flue gas in a coal-fired power plant. *Bioresource Technology*, 190, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.085>
- Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Tsai, M. T., Ong, S. C., Chen, C. H., & Lin, C. S. (2009). Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresource Technology*, 100(2), 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.061>
- Colman, B., Huertas, I. E., Bhatti, S., & Dason, J. S. (2002). The diversity of inorganic carbon acquisition mechanisms in eukaryotic microalgae. *Australian Journal of Plant Physiology*, 29.
- David, W., Templeton, & Laurens, L. M. L. (2015). Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for applications of microalgal biomass conversion to food, feed and fuel. *Algal Research*, 11, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.013>

- De Jesus Raposo, M. F., De Morais, R. M. S. C., & De Morais, A. M. M. B. (2013). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. In *Marine Drugs* (Vol. 11, Issue 1, pp. 233–252). <https://doi.org/10.3390/md11010233>
- Deng, X. Y., Xue, C. Y., Chen, B., Amoah, P. K., Li, D., Hu, X. L., & Gao, K. (2019). Glucose addition-induced changes in the growth and chemical compositions of a freshwater microalga *Chlorella kessleri*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *94*(4), 1202–1209. <https://doi.org/10.1002/jctb.5870>
- DNP. (2022). *Aprobado CONPES de Transición Energética que consolidará el proceso hacia un desarrollo y crecimiento económico sostenible*. [Www.Dnp.Gov.Co](http://www.dnp.gov.co). <https://www.dnp.gov.co/Paginas/CONPES-de-Transicion-Energetica-que-consolidara-el-proceso-hacia-un-desarrollo-y-crecimiento-economico-sostenible-aprobado.aspx>
- Douskova, I., Doucha, J., Livansky, K., MacHat, J., Novak, P., Umysova, D., Zachleder, V., & Vitova, M. (2009). Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*(1), 179–185. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1811-9>
- Duarte, J. H., de Morais, E. G., Radmann, E. M., & Costa, J. A. V. (2017). Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. *Bioresource Technology*, *234*, 472–475. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.066>
- Duarte, J. H., Fanka, L. S., & Costa, J. A. V. (2016). Utilization of simulated flue gas containing CO₂, SO₂, NO and ash for *Chlorella fusca* cultivation. *Bioresource Technology*, *214*(x), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.078>
- EA. (2021). *MUNDO MULTILATERAL #10 – LAS COP (CONFERENCIA DE LAS PARTES) SOBRE EL CAMBIO CLIMÁTICO*. <https://www.embajadaabierta.org/post/mundo-multilateral-10-las-cop-conferencia-de-las-partes-sobre-el-cambio-climático>
- El Economista. (2022). *Fertilizantes incrementan 300% actualmente por guerra entre Rusia y Ucrania*. Agronegocios. <https://www.agronegocios.co/agricultura/fertilizantes-incrementan-300-actualmente-por-guerra-entre-rusia-y-ucrania-3317461>
- Fernandez, J. M. (2014a). *Naturaleza de la luz y su transmisión en medios semitransparentes*. <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-2---disponibilidad-de-luz/2-1-transmision-de-la-luz.html>
- Fernandez, J. M. (2014b). *Naturaleza de la luz y su transmisión en medios semitransparentes*. Universidad de Almería. <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-2---disponibilidad-de-luz/2-1-transmision-de-la-luz.html>
- Ferreira Mota, G., Germano de Sousa, I., Luiz Barros de Oliveira, A., Luthierre Gama Cavalcante,

- A., da Silva Moreira, K., Thálysson Tavares Cavalcante, F., Erick da Silva Souza, J., Rafael de Aguiar Falcão, Í., Guimarães Rocha, T., Bussons Rodrigues Valério, R., Cristina Freitas de Carvalho, S., Simão Neto, F., de França Serpa, J., Karolinny Chaves de Lima, R., Cristiane Martins de Souza, M., & dos Santos, J. C. S. (2022). Biodiesel production from microalgae using lipase-based catalysts: Current challenges and prospects. *Algal Research*, 62(December 2021). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102616>
- Gaitero, A. (2012). Diseño de un Prototipo de Fotobiorreactor para el Cultivo de " Spirulina Platensis ". *Conama*, 25.
- Gao, P., Guo, L., Gao, M., Zhao, Y., Jin, C., & She, Z. (2022). Regulation of carbon source metabolism in mixotrophic microalgae cultivation in response to light intensity variation. *Journal of Environmental Management*, 302(PB), 114095. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114095>
- Gomez, A. (2019). EAFIT y Argos consiguen nueva patente en el cultivo de microalgas. *EAFIT Noticias*. <https://www.eafit.edu.co/noticias/agenciadenoticias/2018/eafit-y-argos-consiguen-nueva-patente-en-el-cultivo-de-microalgas#:~:text=Las microalgas%2C que sirven para,Colombia mediante la resolución No.>
- Greses, S., Tomás-Pejó, E., Markou, G., & González-Fernández, C. (2022). Microalgae production for nitrogen recovery of high-strength dry anaerobic digestion effluent. *Waste Management*, 139(January), 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.12.043>
- Grossmann, L., Ebert, S., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2018). Effect of precipitation, lyophilization, and organic solvent extraction on preparation of protein-rich powders from the microalgae *Chlorella protothecoides*. *Algal Research*, 29(May 2017), 266–276. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.019>
- Guo, Z., Phooi, W. B. A., Lim, Z. J., & Tong, Y. W. (2015). Control of CO₂ input conditions during outdoor culture of *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactors. *Bioresour. Technol.*, 186, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.065>
- He, L., Subramanian, V. R., & Tang, Y. J. (2012). Experimental analysis and model-based optimization of microalgae growth in photo-bioreactors using flue gas. *Biomass and Bioenergy*, 41(314), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.02.025>
- Hernández, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hinz, D. J., Poulton, A. J., Nielsdóttir, M. C., Steigenberger, S., Korb, R. E., Achterberg, E. P., & Bibby, T. S. (2012). Comparative seasonal biogeography of mineralising nannoplankton in the Scotia Sea: *Emiliana huxleyi*, *Fragilariopsis* spp. and *Tetraparma pelagica*. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 59–60, 57–66.

- Hoffmann, B., Münch, S., Schwägele, F., Neusüß, C., & Jira, W. (2017). A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products. *Food Control*, 71, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.021>
- Hulatt, C. J., & Thomas, D. N. (2011). Productivity, carbon dioxide uptake and net energy return of microalgal bubble column photobioreactors. *Bioresource Technology*, 102(10), 5775–5787. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.025>
- Ibañes, H., & Guerrero, M. (2017). *Las algas que comemos*. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=AlzQDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT4&dq=aminoácidos+esenciales+en+algas&ots=m1Jees0aUo&sig=rbQ3LIRxSUqKCcaFbuWMbmbfQ7A#v=onepage&q=aminoácidos+esenciales+en+algas&f=false>
- IEA/Oecd. (2021). *Emisiones netas cero para el escenario 2050 (NZE) - Modelo energético mundial - Análisis - AIE*. IEA. <https://www.iea.org/reports/world-energy-model/net-zero-emissions-by-2050-scenario-nze>
- IEA. (2021). *World Energy Outlook 2021 – Análisis - AIE*. <https://www.iea.org/reports/world-energy-outlook-2021>
- Iglina, T., Iglin, P., & Pashchenko, D. (2022). Industrial CO₂ Capture by Algae: A Review and Recent Advances. In *Sustainability* (Vol. 14, Issue 7, p. 3801). <https://doi.org/10.3390/su14073801>
- IPCC Working Group II. (2022). *IPCC AR6 Working Group II: Headline Statements from the Summary for Policymakers*. 2022(February), 1–2.
- Janssen, RH, Vincken, JP, Van Den Broek, LAM, Fogliano, V. y L. (2017). *Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Three Edible Insects: Tenebrio molitor, Alphitobius diaperinus, and Hermetia illucens.pdf*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00471>
- Jiang, Y., Zhang, W., Wang, J., Chen, Y., Shen, S., & Liu, T. (2013). Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, 128(X), 359–364. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.119>
- Jiménez, C. (2021, December 4). Retos del país frente a los compromisos en la COP 26. *Asuntos Legales*. <https://www.asuntoslegales.com.co/analisis/camila-jimenez-lara-521981/retos-del-pais-frente-a-los-compromisos-en-la-cop-26-3272098>
- Kasiri, S., Ulrich, A., & Prasad, V. (2015). Optimization of CO₂ fixation by *Chlorella kessleri* cultivated in a closed raceway photo-bioreactor. *Bioresource Technology*, 194, 144–155. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.017>
- Kassim, M. A., & Meng, T. K. (2017). Carbon dioxide (CO₂) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. *Science of the Total Environment*, 584–585,

1121–1129. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.172>

- Khodadadi Dehkordi, D., & Shamsnia, S. A. (2020). Application of Reclaimed Sodium Polyacrylate to Increase Soil Water Retention. *Clean - Soil, Air, Water*, 48(11), 1–6. <https://doi.org/10.1002/clen.202000068>
- Kumar, G., Ahmad, S., & Shrivastava, M. (2021). *Circular economy fertilization : Phycoremediated algal biomass as biofertilizers for sustainable crop production*. 287(December 2020).
- Kumar, V., Sharma, N., Jaiswal, K. K., Vlaskin, M. S., Nanda, M., Tripathi, M. K., & Kumar, S. (2021). Microalgae with a truncated light-harvesting antenna to maximize photosynthetic efficiency and biomass productivity: Recent advances and current challenges. *Process Biochemistry*, 104(September 2020), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.03.006>
- Li, S., Li, X., & Ho, S. H. (2022). Microalgae as a solution of third world energy crisis for biofuels production from wastewater toward carbon neutrality: An updated review. *Chemosphere*, 291(P1), 132863. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132863>
- Lim, Y. A., Chong, M. N., Foo, S. C., & Ilankoon, I. M. S. K. (2021). Analysis of direct and indirect quantification methods of CO₂ fixation via microalgae cultivation in photobioreactors: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110579>
- Liu, J. Z., Ge, Y. M., Xia, S. Y., Sun, J. Y., & Mu, J. (2016). Photoautotrophic hydrogen production by *Chlorella pyrenoidosa* without sulfur-deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(20), 8427–8432. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.191>
- López, G., Yate, C., Ramos, F. A., Cala, M. P., Restrepo, S., & Baena, S. (2019). Production of Polyunsaturated Fatty Acids and Lipids from Autotrophic, Mixotrophic and Heterotrophic cultivation of *Galdieria* sp. strain USBA-GBX-832. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46645-3>
- Maia, J. L. da, Cardoso, J. S., Mastrantonio, D. J. da S., Bierhals, C. K., Moreira, J. B., Costa, J. A. V., & Morais, M. G. de. (2020). Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2739–2749. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.159>
- Martinez, V. L. (2010). Implementación de bioprocesos continuos estables para la producción de hidrógeno por fermentación oscura. *Implementación de Bioprocesos Continuos Estables - Dirección General de Investigación y Desarrollo (DGID)*, July, 1–10. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3988.8489>
- Mcsweeney, R., & Tandon, A. (2020). *Global Carbon Project: Coronavirus causes 'record fall' in fossil-fuel emissions in 2020 - Carbon Brief*. CarbonBrief. <https://www.carbonbrief.org/global->

carbon-project-coronavirus-causes-record-fall-in-fossil-fuel-emissions-in-2020/

- Milhazes-Cunha, H., & Otero, A. (2017). Valorisation of aquaculture effluents with microalgae: The Integrated Multi-Trophic Aquaculture concept. *Algal Research*, 24, 416–424. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.011>
- Monaci, L., De Angelis, E., Montemurro, N., & Pilolli, R. (2018). Comprehensive overview and recent advances in proteomics MS based methods for food allergens analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 106, 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.016>
- Montowska, M., & Fornal, E. (2018). Detection of peptide markers of soy, milk and egg white allergenic proteins in poultry products by LC-Q-TOF-MS/MS. *Lwt*, 87, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.091>
- Moreno-Bayona, D. A., Gómez-Méndez, L. D., Blanco-Vargas, A., Castillo-Toro, A., Herrera-Carlosama, L., Poutou-Piñales, R. A., Salcedo-Reyes, J. C., Díaz-Ariza, L. A., Castillo-Carvajal, L. C., Rojas-Higuera, N. S., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2019). Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by *Pleurotus ostreatus* for biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use. *PLoS ONE*, 14(5), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217100>
- Muñoz B., A. (2022, March 14). ¿Qué es el TTF? El gran mercado del gas mundial- El Periódico de la Energía. *El Periódico de La Energía*. <https://elperiodicodelaenergia.com/que-es-el-ttf-el-gran-mercado-del-gas-mundial/>
- Murcia, L., & Parra, M. A. (2018). Producción de proteínas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* enriqueciendo el medio de cultivo con fuentes de nitrógeno. *Analytical Biochemistry*, 11(1), 1–5. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-59379-1%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00002-7%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.024%0Ahttps://doi.org/10.1080/07352689.2018.1441103%0Ahttp://www.chile.bmw-motorrad.cl/sync/showroom/lam/es/>
- Nichols, H. W., & Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *Journal of Phycology*, 1(1), 34–38. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x>
- OLADE. (2022). Panorama Energético de America Latina y el Caribe. In *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents* (Segunda, Vol. 7, Issue 2).
- ONU. (2021). *Lo que necesitas saber sobre la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático COP26*. <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/lo-que-necesitas-saber-sobre-la-conferencia-de-las-naciones-unidas>
- Ortiz, M., Cortés, C., Sánchez, J., Padilla, J., & Otero, A. (2016). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas

- y mixotróficas Evaluating microalgae *Chlorella sorokiniana* growth in different culture mediums in autotrophic and mixotrophic cond. *Red de Revistas Científicas de America Latina*, 11–20.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346–356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
- Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G., & Simões, M. (2012). Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 3043–3053. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.055>
- PLaza, C. A. (2020). *CO-PIRÓLISIS DE BIOMASA BIOGÉNICA PARA LA PRODUCCIÓN DE UN BIOCHAR COMO SUSTRATO DE GERMINACIÓN PARA SEMILLAS*. 68–70.
- Pourjamshidian, R., Abolghasemi, H., Esmaili, M., Amrei, H. D., Parsa, M., & Rezaei, S. (2019). Carbon dioxide biofixation by *Chlorella* sp. In a bubble column reactor at different flow rates and CO₂ concentrations. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36(2), 639–645. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180151>
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). *Commercial and industrial applications of micro algae – A review*. 3(4), 89–100.
- Radmann, E. M., Camerini, F. V., Santos, T. D., & Costa, J. A. V. (2011). Isolation and application of SOX and NOX resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. *Energy Conversion and Management*, 52(10), 3132–3136. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2011.04.021>
- Rendueles, M., & Diaz, M. (2014). *Biotecnología industrial*. CSIC. <https://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/1957/2287>
- Rivera, A., Peraza, A., & Valencia, V. (2011). La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* : nueva alternativa para la producción de. *Ciencia*, 2–9.
- Roca, J. A. (2022, March 17). El precio del carbón en Europa alcanza su nivel más alto en más de 200 años- El Periódico de la Energía. *El Periódico de La Energía*. <https://elperiodicodelaenergia.com/el-precio-del-carbon-en-europa-alcanza-su-nivel-mas-alto-en-mas-de-200-anos/>
- Rosa, A. P. C. Da, Carvalho, L. F., Goldbeck, L., & Costa, J. A. V. (2011). Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*, 52(8–9), 3071–3073. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2011.01.008>

- RTVE. (2022, April 12). *El comercio mundial sufrirá gravemente por la guerra de Ucrania y el confinamiento de China* - RTVE.es. <https://www.rtve.es/noticias/20220412/comercio-mundial-sufrira-gravemente-guerra-ucrania-confinamiento-china/2330700.shtml>
- Rubio Fernández, D., Ángel, M. C., & Pimienta, W. (2013). Incidencia del nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos de la microalga *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala laboratorio. In *Revista de Investigación* (Vol. 6, Issue 1, pp. 7–18). <https://doi.org/10.29097/2011-639x.140>
- Ruiz, Jesús. Olivieri, G. V. (2016). *Towards industrial products from microalgae _ Enhanced Reader.pdf*. Energy & Environmental Science. <https://doi.org/10.1039/c6ee01493c>
- Rushan, N. H., Mat Yasin, N. H., & Said, F. M. (2021). The effect of culture medium on the oil yield and fatty acid methyl ester of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemical Engineering Communications*, 208(4), 592–600. <https://doi.org/10.1080/00986445.2020.1864622>
- San Ignacio de Loyola. (2018). Introducción a los bioreactores. *Autobiografía de San Ignacio de Loyola*, 134–153. <https://doi.org/10.2307/j.ctv893j76.10>
- Santamaría, D. (2011). Algas Termófilas: Revisión y caso de estudio Parque nacional natural Los Nevados. *Phys. Rev. E*, 24. http://ridum.umanizales.edu.co:8080/jspui/bitstream/6789/377/4/Muñoz_Zapata_Adriana_Patricia_Artículo_2011.pdf
- Souza, M. F. L., Longhini, C. M., Silva, A. M., & Lentini, C. A. D. (2012). Carbon Cycle: Biogeochemical, Physical processes and compartment interactions in the Todos os Santos Bay. *Revista Virtual de Química*, 4(5), 566–582. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120044>
- Sullivan, A. (DW). (2021). *Los altos precios de energía depararán un duro invierno a Europa | Economía | DW | 21.09.2021*. DW/Actualidad/Economía. <https://www.dw.com/es/los-altos-precios-de-energía-depararán-un-duro-invierno-a-europa/a-59253643>
- Sydney, E. B., da Silva, T. E., Tokarski, A., Novak, A. C., de Carvalho, J. C., Woiciehowski, A. L., Larroche, C., & Soccol, C. R. (2011). Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy*, 88(10), 3291–3294. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.024>
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., & Zhong, J. (2011). CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*, 102(3), 3071–3076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.047>
- Thawechai, T., Cheirsilp, B., Louhasakul, Y., Boonsawang, P., & Prasertsan, P. (2016). Mitigation of carbon dioxide by oleaginous microalgae for lipids and pigments production: Effect of light

illumination and carbon dioxide feeding strategies. *Bioresource Technology*, 219, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.109>

Torres, E., & Herrero, C. (1995). *Microalgas : Cultivo y aplicaciones*.

Torroba, A., & Brenes, C. (2022). *La importancia geopolítica del sector agropecuario en la seguridad energética a raíz de la guerra entre Rusia y Ucrania: el papel de los biocombustibles / Blog del IICA*. <https://blog.iica.int/blog/importancia-geopolitica-del-sector-agropecuario-en-seguridad-energetica-raiz-guerra-entre>

Umamaheswari, J., & Shanthakumar, S. (2021). Paddy-soaked rice mill wastewater treatment by phycoremediation and feasibility study on use of algal biomass as biofertilizer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 96(2), 394–403. <https://doi.org/10.1002/jctb.6551>

Urbano, T. (2019). *Cultivo de Microalgas - Historia, Utilidad y Ventajas - Agrotendencia.tv*. Agrotendencia. <https://agrotendencia.tv/agropedia/el-cultivo-de-microalgas/>

Wang, C., Li, H., Wang, Q., & Wei, P. (2010). Effect of pH on growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* cultured in biogas slurry. *Chinese Journal of Biotechnology*, 26(8), 1074–1079, 21090111.

Wong, Y. (2017). Growth Medium Screening for *Chlorella vulgaris* Growth and Lipid Production. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.15406/jamb.2017.06.00143>

Yadav, G., Karemore, A., Dash, S. K., & Sen, R. (2015). Performance evaluation of a green process for microalgal CO₂ sequestration in closed photobioreactor using flue gas generated in-situ. *Bioresource Technology*, 191, 399–406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.040>

Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., & Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). In *Journal of Plant Research* (Vol. 117, Issue 4, pp. 257–264). <https://doi.org/10.1007/s10265-004-0154-6>

Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., & Chen, Y. (2011). Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*, 102(1), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.017>

Yunga Atapuma, J. (2018). *Caracterización de la microalga fischerella muscicola, para evaluar la biomasa y su potencial uso en la industria alimenticia*.

Zanin, T. (2022). *Alimentos con proteínas (de origen animal y vegetal) - Tua Saúde*. TUA Saúde. <https://www.tuasaude.com/es/alimentos-ricos-en-proteinas/>