

Evaluación de las condiciones experimentales básicas para la producción de biomasa a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*

Y. Sánchez-Borroto^{1,*}, I. Tobío-Pérez², T. de J. Romero-López³, Y. Díaz-Domínguez², E. Ahmed Melo-Espinosa¹ y R. Piloto-Rodríguez¹

¹Centro de Estudio de Tecnologías Energéticas Renovables (CETER), Facultad de Ingeniería Mecánica, Universidad Tecnológica de la Habana "José Antonio Echeverría" (Cujae), Marianao, 19390, La Habana, Cuba

²Facultad de Ingeniería Química, Universidad Tecnológica de la Habana "José Antonio Echeverría", (Cujae), Marianao, 19390, La Habana, Cuba

³Centro de Investigaciones Hidráulicas (CIH), Facultad de Ingeniería Civil, Universidad Tecnológica de la Habana "José Antonio Echeverría" (Cujae), Marianao, 19390, La Habana, Cuba

Assessment of basic experimental conditions for biomass production from Chlorella vulgaris microalgae

Avaluació de les condicions experimentals bàsiques per a la producció de biomassa a partir de la microalga Chlorella vulgaris

RECEIVED: 30 MAY 2018; ACCEPTED: 30 JUNE 2018

SUMMARY

Using microalgae as a source of energy for producing oil and biodiesel presents many advantages respect feedstocks. The microalgae shows a high yield per cultivated area, there are several output as final biofuels products and does not compete with food production, being classified as a third generation biofuel. The influence of microalgae biomass yield under different culture conditions are in this paper analyzed. The microalgae *Chlorella vulgaris* culture was developed at laboratory scale using 6 elermeyers of 250 mL following the methodology described in the Watanabe medium modified. The culture conditions were $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ with a pH value between 6-7. The cell count through microscopy let the speed grows determination of the studied microalgae strain for ten days reaching the maximum concentration of cells with vitamins and air supply, registering 450.5×10^4 cells/mL. At five days of culture, the yield of those including vitamins was 8 times higher compared to the Start of experiments, but 7 times without vitamins. The highest yield was registered for a culture with vitamins and air supply, twenty times higher than the respective values for the first day. The obtained results demonstrated the *Chlorella vulgaris* microalgae potential for its use on energetic purposes, particularly for biodiesel production.

Keywords: Biomass; biodiesel; microalgae; *Chlorella vulgaris*.

RESUMEN

La utilización de las microalgas como fuente de energía para la obtención de aceite y biodiesel presenta muchas ventajas respecto a otras materias primas. Las microalgas tienen un alto rendimiento por superficie cultivada, diversifica el tipo de combustible a producir y no compite con la producción de alimentos, siendo clasificado como un biocombustible de tercera generación. En el presente trabajo se evalúa la influencia del rendimiento de biomasa microalgal bajo diferentes condiciones de cultivo. La microalga *Chlorella vulgaris* fue cultivada a escala de laboratorio utilizando 6 elermeyers de 250 mL siguiendo la metodología descrita en el medio de cultivo Watanabe modificado. Las condiciones de cultivo fueron $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con un pH aproximado entre 6 y 7. A partir del recuento celular mediante microscopía fue posible determinar la velocidad de crecimiento de la microalga en estudio con una duración de diez días; alcanzándose la máxima concentración de células en el cultivo con vitaminas y

*Corresponding author: ysanchez@ceter.cujae.edu.cu;
yiselsanchezborroto86@gmail.com

suministro de aire de 450.5×10^4 células/mL. A los cinco días los cultivos con vitaminas mostraron 8 veces mayor rendimiento, mientras que sin estas 7 veces. El mayor incremento se registró para el cultivo con vitaminas y suministro permanente de aire el cual incrementó su producción de biomasa 20 veces. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran el potencial que tiene la microalga *Chlorella vulgaris* para su uso con fines energéticos, encaminados fundamentalmente a la obtención de biodiesel.

Palabras clave: Biomasa; biodiesel; microalga; *Chlorella vulgaris*.

RESUM

La utilització de les microalgues com a font d'energia per a l'obtenció d'oli i biodièsel presenta molts avantatges respecte a altres matèries primeres. Les microalgues tenen un alt rendiment per superfície conreada, diversifica el tipus de combustible a produir i no competeix amb la producció d'aliments, sent classificat com un biocombustible de tercera generació. En el present treball s'avalua la influència del rendiment de biomassa microalgal sota diferents condicions de cultiu. La microalga *Chlorella vulgaris* va ser conreada a escala de laboratori utilitzant 6 erlenmeyer de 250 ml seguint la metodologia descrita en el medi de cultiu Watanabe modificat. Les condicions de cultiu van ser $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ amb un pH aproximat entre 6 i 7. A partir del recompte cel·lular mitjançant microscòpia va ser possible determinar la velocitat de creixement de la microalga en estudi amb una durada de deu dies; aconseguint-se la màxima concentració de cèl·lules en el cultiu amb vitamines i subministrament d'aire de 450.5×10^4 cèl·lules/ml. Als cinc dies els cultius amb vitamines van mostrar 8 vegades més gran rendiment, mentre que sense aquestes 7 vegades. El major increment es va registrar per al cultiu amb vitamines i subministrament permanent d'aire el qual va incrementar la seva producció de biomassa 20 vegades. Els resultats obtinguts en aquesta investigació demostren el potencial que té la microalga *Chlorella vulgaris* per al seu ús amb finalitats energètiques, encaminats fonamentalment a l'obtenció de biodièsel.

Paraules clau: Biomassa; biodièsel; microalga; *Chlorella vulgaris*.

1. INTRODUCCIÓN

Durante décadas los combustibles fósiles han sido la principal fuente energética y el motor impulsor de la economía mundial ¹, sin embargo, en la actualidad el mundo enfrenta grandes problemas y retos en este sentido: la disminución de las reservas petroleras unido a las constantes fluctuaciones de

los precios del petróleo y la contaminación causada por la combustión de los combustibles fósiles dando lugar al incremento de gases cuya presencia en la atmósfera contribuyen al efecto invernadero, causa principal del deterioro de la calidad del aire, y el origen de numerosos problemas sanitarios, económicos y ambientales.

El 80% de la energía empleada actualmente en el mundo proviene de los combustibles fósiles, por lo que muchos estudios están orientados a la búsqueda de combustibles alternativos que logren cubrir la demanda de energía, permitan la independencia energética respecto a los precios del petróleo en el mercado internacional y que su uso no provoque efectos nocivos para el medio ambiente ²⁻⁵. Los combustibles alternativos, también conocidos como biocombustibles se producen orgánicamente y a diferencia de los combustibles fósiles son una fuente de energía renovable. Los biocombustibles son sustancias carburantes en estado líquido, sólido o gaseoso, que liberan energía en forma de calor en presencia de oxígeno y una fuente de energía de activación.

Entre los biocombustibles se incluyen el biogás, la biomasa, el hidrógeno, los bio-alcoholes, los aceites vegetales, las grasas animales y sus derivados. Pueden ser obtenidos a partir de la biomasa proveniente de residuos agrícolas, forestales, animales, industriales y municipales ^{1,2}. No obstante, definir y analizar los efectos de los biocombustibles sobre el medioambiente, así como su cadena de producción (desde su cultivo u obtención hasta su distribución) es un aspecto imprescindible para su futura utilización. Por estas razones, es importante tener en cuenta que los biocombustibles solo serán beneficiosos si se cultivan de manera sostenible con la biodiversidad y teniendo en cuenta los elementos fundamentales del conocido debate "alimentos vs combustibles" ⁶.

En los últimos años ha tenido lugar una rápida expansión de la industria del biodiesel a partir de fuentes alimentarias. Para lograr acercarnos a un desarrollo sostenible en la industria de los biocombustibles es necesario encontrar fuentes de biomasa no alimenticias, que consuman menos áreas de cultivo y cuya implementación a gran escala posea un bajo impacto ambiental. Es por ello que las investigaciones y la industria relativas a los biocombustibles han evolucionado desde los que clasificaron como de primera generación hasta los de tercera. En este contexto es que comienza a cobrar gran importancia la producción de biodiesel y biocombustibles en general a partir de microalgas.

Actualmente la obtención de biodiesel a partir de microalgas ha recibido mucha atención por parte de la comunidad científica ⁵, dado el interés que existe de encontrar fuentes de energías renovables que sean amigables con el medio ambiente ⁷. Muchas investigaciones han sido desarrolladas con el objetivo de utilizar este microorganismo como fuente de energía para producir biodiesel ⁸. Las microalgas presentan grandes ventajas respecto a otras

materias primas, como por ejemplo: no compiten con la producción de alimentos ^{6, 9}, no requieren del uso de tierras fértiles y el empleo de superficie terrestre es mínimo ^{10, 11}, pueden crecer en disímiles zonas adaptándose fácilmente a las condiciones medioambientales ¹², logran desarrollarse y crecer en aguas residuales utilizando los nutrientes de la misma, aspecto muy importante debido a que reduce el uso de aguas frescas [13, 14], tienen una alta eficiencia fotosintética ¹⁵ y son grandes secuestradores de CO₂ ^{9, 14, 16, 17}, lo que ayuda a reducir las emisiones de gas de efecto invernadero y crecen en un amplio rango de temperaturas (entre -2°C y 50°C).

Además, estos microorganismos son capaces de producir cantidades significativas de biomasa ¹⁸ y aceite para su posterior transformación en biodiesel ², como también se puede obtener una amplia gama de otros biocombustibles ^{4, 19, 20}. Según Demirbas ³ el rendimiento de aceite obtenido de las microalgas es de 100000 L/ha/año, 15 veces superior al aceite de palma, así como también para el biodiesel es de 39000 L/ha/año ²¹. No obstante, es válido señalar que la obtención de biodiesel a partir de microalgas no es una alternativa energética sostenible debido a los altos costos económicos que representa su cultivo en comparación con otras materias primas.

Por todo lo antes expuesto, las microalgas son una fuente potencial de energías renovables que ha ganado importancia en todo el mundo. La producción de biocombustibles a partir de microalgas puede ser una alternativa viable en un futuro cercano, además pudiera reemplazar en parte o totalmente a los combustibles fósiles ²². No obstante, es válido tener en cuenta que existen varios factores que influyen significativamente en el rendimiento de la biomasa y en el contenido de lípidos de estos microorganismos, por lo que se hace necesario tener presentes estos aspectos con vistas a incrementar los rendimientos de biomasa para la posterior obtención de biocombustibles. Estos requerimientos son la composición y las condiciones del medio de cultivo. De ahí que el objetivo de este estudio consiste en determinar la influencia de las condiciones de cultivo adecuadas para obtener un mayor rendimiento de biomasa utilizando la microalga *Chlorella vulgaris* como un primer paso para la producción de biodiesel.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Generalidades sobre la especie de microalga seleccionada

La especie de alga seleccionada para su cultivo fue la microalga *Chlorella vulgaris* de procedencia cubana, suministrada por el Centro de Investigaciones Pesqueras de Cuba. Es un género de alga verde unicelular, sus células tienen forma esférica, miden de 2 a 10 µm de diámetro y no poseen flagelo. Es una especie de microalga que se reproduce rápidamente a través de la fotosíntesis. La microalga *Chlorella vulgaris* es una de las especies más estudiadas e in-

vestigadas como recurso para reemplazar los combustibles fósiles ⁹ y es por ello, además de su amplia presencia en la naturaleza cubana lo que determinó su selección. Esta especie además de presentar elevado contenido lipídico en su estructura, presenta una elevada productividad de biomasa y por ende también de lípidos. Presenta un corto ciclo de crecimiento por lo que el tiempo de cultivo es menor con respecto a otras especies, disminuyendo así los riesgos de contaminación con microorganismos no deseados.

2.2. Condiciones de cultivo

La microalga fue cultivada a escala de laboratorio utilizando el medio Watanabe, con una modificación en la solución de vitaminas, tomando como referencia el medio de cultivo Guillard H/2 (modificado). Se prepararon cultivos en erlenmeyers de 250 mL con un régimen de iluminación continua de 2000 lux, mediante la utilización de una fuente de luz artificial, con lámparas fluorescentes de 36 W colocadas a una distancia de 10 cm del cultivo.

El crecimiento de las microalgas puede estar influido por una variedad de factores tanto físicos como nutricionales. Los factores físicos incluyen fundamentalmente la concentración de iones hidrógeno (pH), la temperatura, intensidad de la luz y salinidad, mientras que los factores nutricionales comprenden la disponibilidad de carbono, nitrógeno, fósforo, así como otros minerales y vitaminas. Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron los nutrientes descritos en la Tabla 1, tomando como referencia el medio de cultivo Watanabe.

Tabla 1. Nutrientes utilizados en la preparación del medio de cultivo

Reactivos	Masa molar (Kg/kmol)	Concentración (g/L)
Cloruro de potasio	74.55	0.25
Sulfato de magnesio	246.51	0.55
Nitrato de calcio	236.18	1.00
Sulfato de hierro (II)	278.05	0.02
Dihidrógeno Fosfato de potasio	136.09	0.26

Para la preparación de la solución de vitaminas se utilizó el medio de cultivo Guillard H/2 (modificado), el cual está diseñado para preparar pequeños volúmenes. Se pesaron las vitaminas (B₁: 10 g, B₁₂: 0,1 g) en una balanza analítica con 0,1 mg de precisión. Se disolvieron cada una por separado para preparar la solución madre en un litro de agua destilada y se almacenaron a 4°C en frascos color ámbar de cristal. Una vez preparadas las soluciones madres, se procedió a preparar la solución definitiva de trabajo. Se extrajeron 10 mL de solución madre de cada vitamina por separado con una pipeta estéril y se llevó a un litro de agua destilada. Una vez preparada la solución madre con vitaminas, se ajustó el pH con un pH-metro Inolab y luego se introdujo la solución en autoclave. De esta segunda

dilución se extrajeron 0.25 mL de cada una para añadir al medio de cultivo.

2.3. Proceso de inoculación

El proceso de inoculación consistió en la adición de 25 mL de cepa en 225 mL de solución de nutrientes en cada erlenmeyer (el estudio fue realizado en 6 erlenmeyer). A tres de ellos se le añadió 0.25 mL de cada solución de vitamina y los tres restantes se mantuvieron sin vitaminas para su posterior comparación en cuanto a velocidad de crecimiento y productividad de biomasa. Posteriormente se homogenizaron cada uno de los cultivos para medir la temperatura y el pH, estableciendo de esta manera las condiciones necesarias para el crecimiento de la microalga. Las condiciones de cultivo fueron a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con un valor de pH aproximado entre 6 y 7 para los 6 erlenmeyers. La agitación se logró por burbujeo mediante una bomba de aire AQT-3001 y solo fue aplicada en uno de los erlenmeyers que contiene vitaminas, con el objetivo de analizar la influencia de la agitación del cultivo y suministro de aire durante su crecimiento.

2.4. Concentración de biomasa microalgal. Recuento celular

La concentración de la microalga *Chlorella vulgaris* fue determinada diariamente por mediciones de densidad óptica en un espectrofotómetro Rayleigh (VIS-723G). Primeramente fue realizado un análisis espectral para determinar la longitud de onda a la que se obtienen los mejores valores de absorbancia (Abs) de la cepa en estudio. Posteriormente se efectuaron diez diluciones de la cepa con agua destilada en un volumen de 5 mL, las que fueron sometidas a mediciones de absorbancia y conteo celular con el objetivo de obtener una curva de calibración basada en la existencia de una relación lineal entre un carácter medible (Abs) y la variable a determinar (concentración de biomasa).

Se llevó a cabo el estudio por numeración directa a través de un microscopio óptico. Para ello fue utilizada una cámara de conteo celular Neubauer, la cual se basa en contar un volumen determinado de muestras (10 en este caso) entre una lámina y una laminilla rígida (cubre-objetos especial) colocada sobre dos plataformas laterales a una altura establecida. En la Figura 1 se puede observar uno de los cuadrículados de esta cámara. Cada cuadrículado presenta 9 cuadrantes de 1mm^2 cada uno, que a su vez están subdivididos en 16 cuadrados en los extremos y 25 en el central. La altura establecida para la muestra es de 0.1 mm y está determinada por la altura de la plataforma donde se coloca la laminilla rígida con relación a la superficie del cuadrante. Una vez concluido el conteo celular y las mediciones de absorbancia de cada muestra, se dispone de diez puntos para el trazado de la curva de calibración a partir de la cual se ajusta un modelo matemático que relaciona ambas variables.

Una vez obtenida la función matemática que ajusta la curva de calibración, se midió diariamente la absorbancia de los cultivos para conocer la concentración

de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* y de esta manera obtener la cinética de crecimiento de la misma en un período de 10 días aproximadamente.

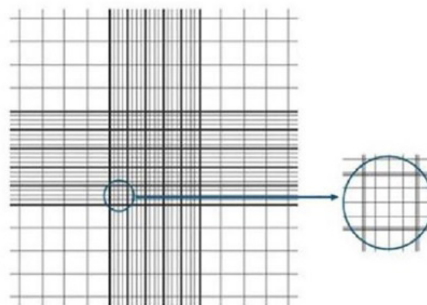


Figura 1. Cuadrículado de la cámara de Neubauer

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Comportamiento del pH y la temperatura durante la producción de biomasa microalgal

Durante el período de cultivo se notó un ligero aumento en los valores de pH a partir del cuarto día de cultivo (entre 7 y 8); de igual manera sucedió con la temperatura (30°C). Este comportamiento es de esperar cuando la fuente de nitrógeno está compuesta por nitratos, en este caso $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Con respecto a la temperatura debe tenerse en cuenta que la iluminación continua provoca el incremento en algunos grados celsius de la temperatura del cultivo. No obstante, según Baicha [23] este valor de temperatura no sobrepasa el rango óptimo ($20\text{--}30^{\circ}\text{C}$) para el crecimiento de las microalgas. Mientras, que valores que se encuentren fuera de este rango pudieran ocasionar daño celular. Así lo demostró Converti y otros colaboradores [24] en su investigación sobre el efecto que ocasiona el aumento de la temperatura sobre el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*. Los resultados obtenidos indican que un incremento de la temperatura por encima de 30°C afecta el crecimiento de esta microalga.

3.2. Curva de calibración para la producción de biomasa microalgal

Tabla 2. Valores de concentración y absorbancia para cada muestra

Diluciones (mL)	X (células/mL)	Abs (680 nm)
5.0	149.87×10^4	0.206
4.5	139.12×10^4	0.224
4.0	92.00×10^4	0.126
3.5	87.87×10^4	0.176
3.0	83.25×10^4	0.149
2.5	40.12×10^4	0.097
2.0	34.62×10^4	0.105
1.5	28.38×10^4	0.034
1.0	23.00×10^4	0.042
0.5	18.87×10^4	0.020

En la Tabla 2 se muestran la cantidad de células/mL contadas en el microscopio óptico a las diluciones de la cepa, así como los valores de absorbancia medidos

a 680 nm. De esta manera se obtuvieron 10 puntos para trazar la curva de calibración (ver Figura 2), la cual relaciona de manera lineal la concentración de microalga en estudio (eje x) con el valor de absorbancia obtenido para cada muestra.

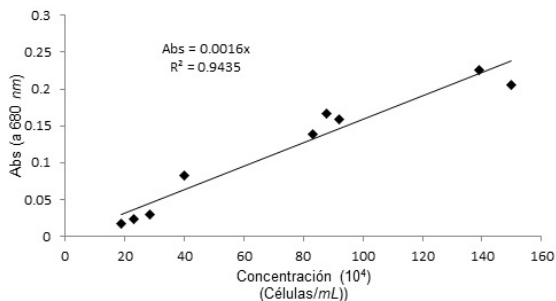


Figura 2. Curva de calibración para la producción de biomasa microalgal

3.3. Efecto del suministro de aire en el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*

Las microalgas como cualquier organismo fotosintético crecen a expensas de una nutrición autotrófica principalmente, por lo que es fundamental para su crecimiento un adecuado abastecimiento de luz y CO₂. Por tal razón uno de los aspectos que influyen de manera significativa en la cinética de crecimiento de las microalgas, y por ende en la productividad de biomasa, es el suministro de aire al cultivo. De los tres erlenmeyers preparados con vitaminas (4, 5 y 6), a solo uno de ellos se le suministró un flujo de aire (erlenmeyer 5). El crecimiento microalgal se comporta de manera proporcional al suministro de aire, puesto que a medida que este aumenta, los cultivos alcanzan densidades celulares superiores. Por tanto, como era de esperar, el máximo crecimiento se alcanzó en el cultivo aireado, mientras que los otros dos se comportaron de igual manera entre sí durante todo el período de cultivo (ver Tabla 3). Es válido destacar que a pesar de que en el cultivo 5 se alcanzan mayores valores de concentración con respecto a los cultivos 4 y 6, en los tres casos la fase de crecimiento exponencial comienza a los dos días de iniciado el cultivo, y a partir del sexto día la velocidad de crecimiento toma pendiente negativa, por lo que se manifiesta la etapa de declive.

3.4. Cinética de crecimiento

La Figura 3 muestra la curva de crecimiento de la *Chlorella vulgaris* en cultivos bajo diferentes condiciones (sin vitaminas, con vitaminas y con vitaminas y suministro de aire), donde se definen seis fases de su crecimiento. En los tres tipos de cultivo, la adaptación al medio se comportó de manera rápida con una duración de 24 horas a partir de la cual comienza a observarse la fase de aceleración positiva. A partir del segundo día de cultivo se incrementa la masa celular de manera exponencial, por lo que está presente la fase de crecimiento logarítmico donde se alcanza la velocidad máxima de crecimiento. Pasados dos días se percibe una disminución de la

velocidad de crecimiento que conlleva a la etapa de desaceleración con una duración de 24 horas. Debido al agotamiento de los nutrientes y acumulación de contaminantes, ocurre un cese completo del crecimiento dando lugar a la fase estacionaria. A partir del séptimo día la mortalidad de las células es muy significativa. Cuando la tasa de mortalidad de las células aumenta, se inicia la última fase de la curva de crecimiento, donde la velocidad toma pendiente negativa.

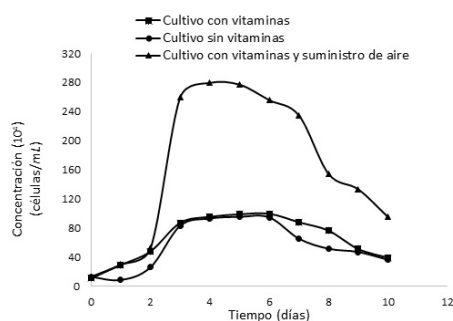


Figura 3. Cinética de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* bajo diferentes condiciones de cultivo

En cuanto a las curvas de los cultivos sin vitaminas y con vitaminas sin aireación, ambos mantuvieron un comportamiento similar en cuanto a la concentración de células alcanzadas en la etapa logarítmica, sin embargo, en el cultivo con aireación se alcanzaron mayores valores de concentración, manteniéndose el mismo comportamiento durante los diez días de cultivo, lo que significa que los mayores valores de productividad de biomasa microalgal, deben alcanzarse para el cultivo 5.

Un resultado importante fue alcanzado en el quinto día de cultivo (ver Tabla 3). La producción de células según el conteo realizado muestra un incremento notable con respecto a los niveles de producción al comienzo de los cultivos. Si se toma en cuenta que el conteo celular es una medida directa de la producción de biomasa microalgal, podemos decir que a los cinco días los cultivos con vitaminas muestran 8 veces mayor rendimiento, mientras que sin vitaminas 7 veces. El mayor incremento se registra para el cultivo con vitaminas y suministro permanente de aire el cual incrementó su producción de biomasa 20 veces.

Investigadores como Bermeo²⁵ desarrollaron cultivos de microalga *Chlorella vulgaris* en aguas residuales. La microalga fue cultivada a escala de laboratorio en fotobiorreactores tipo pyrex de 2L. Los experimentos fueron realizados bajo un ambiente controlado de temperatura, pH, luminosidad y burbujeo de aire para mantener una homogenización constante. Los resultados obtenidos respecto a la cinética de crecimiento de la microalga evidenciaron que inicialmente (durante el primer y segundo día) comienza la fase de latencia seguido por una fase de crecimiento exponencial a partir del tercer o cuarto día, y luego debe surgir la etapa de crecimiento estacionario.

Tabla 3. Resultados de la cinética de crecimiento en diferentes condiciones experimentales

Días	Células/mL (10 ⁴)		
	Cultivo con vitaminas (4 y 6)	Cultivo con vitaminas y suministro de aire (5)	Cultivos sin vitaminas (7, 8 y 9)
0	16.50	20.00	19.70
1	31.00	27.00	12.70
2	76.00	83.00	41.00
3	139.00	416.00	132.70
4	152.50	465.50	148.70
5	157.80	457.20	152.20
6	159.00	455.70	151.10
7	140.30	376.00	104.00
8	121.70	247.00	81.80
9	81.10	213.00	74.67
10	62.20	152.00	57.40

Esta etapa es de vital importancia en el cultivo de microalgas, debido a que es el período donde se aplican métodos para separar la biomasa microalgal del medio de cultivo, luego se extrae el porcentaje de lípidos presente, para finalmente transesterificar y obtener biodiesel.

Los resultados obtenidos en esta investigación comparados con los alcanzados por Bermeo²⁵, a pesar de las diferencias en las condiciones de cultivo, guardan una gran similitud. En ambos trabajos la etapa donde se alcanza la máxima velocidad de crecimiento comienza alrededor de las 48 horas con una duración de dos a tres días, lo que indica una rápida adaptación al medio de cultivo en ambos casos.

Otra investigación fue desarrollada en Cuba, en el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)²⁶. Fue realizado un estudio sobre el cultivo de microalgas para la producción de biodiesel utilizando 6 cepas procedentes de la colección de cultivos del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, entre las que se encontraba la microalga *Chlorella vulgaris*. Las cepas fueron cultivadas en erlenmeyers de 150 mL bajo condiciones estándares, utilizando el medio Bristol. Los cultivos se desarrollaron con régimen de iluminación continua a 3500 lux, que fue lograda mediante la utilización de lámparas fluorescentes de 40 W. La curva de crecimiento de la microalga en estudio presentó un comportamiento similar al obtenido por Bermeo²⁵ y al del presente trabajo. A partir del tercer día de cultivo iniciando la fase exponencial se alcanzó una concentración alrededor de 10⁶ células/mL, de manera tal que al final de la fase exponencial se obtuvo una productividad de biomasa de 0.150 g/L/día, además de presentar el mayor contenido lipídico (42 mg/L/día) en su estructura. Este resultado representa una ventaja para trabajos futuros con vistas a su explotación como fuente de ácidos grasos para la producción de biodiesel.

Según lo antes expuesto, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta investigación en correspondencia con los trabajos citados, es válido señalar que dichos resultados pueden ser utilizados con fines energéticos, encaminados fundamentalmente a la obtención de biodiesel, bajo las mismas condiciones de cultivo establecidas en la presente investigación.

CONCLUSIONES

Se demostró que la microalga *Chlorella vulgaris* puede crecer en el medio de cultivo Watanabe modificado, con excelente período de adaptabilidad y desarrollo. La cinética de crecimiento de los cultivos tuvo una duración de diez días donde estuvieron presentes las seis fases de la curva de crecimiento. Se determinaron las mejores condiciones de cultivo para la producción de biomasa a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*, destacándose el suministro de aire como factor de gran influencia en el crecimiento microalgal. Se alcanzó la máxima concentración de células en el cultivo con vitaminas y suministro de aire con un valor de 465.5×10⁴ células/mL al cuarto día de cultivo. Mientras que en los cultivos con vitaminas y sin vitaminas se obtuvieron 159×10⁴ células/mL, al sexto día y 152×10⁴ células/mL al quinto día, respectivamente. A los cinco días, los cultivos con vitaminas mostraron 8 veces mayor rendimiento, mientras que sin estas 7 veces. El mayor incremento se registró para el cultivo con vitaminas y suministro permanente de aire el cual incrementó su producción de biomasa 20 veces. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran el potencial que tiene la microalga *Chlorella vulgaris* para su uso con fines energéticos, encaminados fundamentalmente a la obtención de biodiesel y que realizando modificaciones en la composición química del medio de cultivo es posible obtener resultados adecuados de producción de biomasa.

REFERENCIAS

1. Agarwal, A.K., Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for Internal Combustion Engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, **2007**. 33: p. 233-271.
2. Demirbas, A., *Biodiesel. A realistic fuel alternative for diesel engines*. **2008**, London: Springer-Verlag.
3. Demirbas, A. and M.F. Demirbas, *Algae as a new source of Biodiesel*. Green Energy and Technology, ed. Springer. 2010, London: Springer.
4. Demirbas, A., *Use of algae as biofuel source*. Energy Conversion & Management, **2010**. 51: p. 2738-2749.
5. Demirbas, A. and M.F. Demirbas, *Importance of algae oil as a source of biodiesel*. Energy Conversion & Management, **2011**. 52: p. 163-170.
6. ElBassam, N., *Handbook of bioenergy crops*, ed. Earthscan. **2010**, London.
7. Scragg, A.G., J. Morrison, and S.W. Shales, *The use of a fuel containing Chlorella vulgaris in a diesel engine*. Enzyme and Microbial Technology, **2003**. 33: p. 884-889.
8. Demirbas, A., Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Applied Energy*, **2011**. 88: p. 3541-3547.
9. Gouveia, L., *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. Springer briefs in Microbiology, ed. Springer. **2011**, Netherlands: Springer.

10. Kovacevic, V. and J. Vesseler, Cost-effectiveness analysis of algae energy production in the EU. *Energy Policy*, **2010**. 38: p. 5749-5757.
11. Najafi, G., B. Ghobadian, and T.F. Yusaf, Algae as a sustainable energy source for biofuel production in Iran: A case study. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2011**. 15: p. 3870-3876.
12. Sudhakar, K., et al., An overview of marine macroalgae as bioresource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2018**. 91: p. 165-179.
13. Ramachandra, T.V., et al., Algal biofuel from urban wastewater in India: Scope and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2013**. 21: p. 767-777.
14. Brennan, L. and P. Owende, Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2010**. 14: p. 557-577.
15. Zhang, B. and K. Ogden, Recycled wastewater from anaerobic digestion of lipid extracted algae as a source of nutrients. *Fuel*, **2017**: p. 705-712.
16. Bilanovic, D., M. Holland, and R. Armon, Microalgal CO₂ sequestering-Modeling microalgae production costs. *Energy Conversion & Management*, **2012**. 58: p. 104-109.
17. Da Rosa, A.P.C., et al., Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion & Management*, **2011**. 52: p. 3071-3073.
18. Borowitzka, M.A. and N.R. Moheimani, Algae for Biofuels and Energy. *Developments in applied phycology*, ed. Springer. **2013**, Netherlands: Springer.
19. Sadeghinezhad, E., et al., A comprehensive literature review of bio-fuel performance in internal combustion engine and relevant costs involvement. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2014**. 30: p. 29-44.
20. Satputaley, S.S., C. Chawane, and N.V. Deshpande, A critical review of biofuels from algae for sustainable development in National Conference on Innovative *Paradigms in Engineering & Technology*. **2012**.
21. Gallagher, B.J., The economics of producing biodiesel from algae. *Renewable Energy*, **2011**. 36: p. 158-162.
22. Loures, C. and M. Amaral, Simultaneous esterification and transesterification of microbial oil from *Chlorella minutissima* by acid catalysis route: A comparison between homogeneous and heterogeneous catalysts. *Fuel*, **2018**. 211: p. 261-268.
23. Baicha, Z., et al., A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. *Fuel Processing Technology*, **2016**: p. 1-13.
24. Converti, A., et al., Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing* **2009**. 48: p. 1146-1151.
25. Bermeo, L.E., Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado. **2011**, Universidad Técnica Particular de Loja.
26. Valdes, A. and M.A. Vales, *La producción de biocombustibles y su impacto alimentario, energetico y medioambiental. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo*. CYTED. ISBN 978-959-7136-95-8. 2012.