



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 1

Neiva, 20 de noviembre de 2021

Señores
CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN
UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Jeniffer Rivas Avilez, con C.C. No. 1075247369

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado

Titulado: Fotoperiodo e intensidad lumínica en la producción de lípidos a partir de *Chlorella* sp., como fuente potencial para la obtención de biodiesel.

presentado y aprobado en el año 2021 como requisito para optar al título de Magister en Ingeniería y Gestión Ambiental.

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: _____

Vigilada Mineducación



CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSION	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 4
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

Grabados___ Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___
Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas o Cuadros_x_

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (*En caso de ser LAUREADAS o Meritoria*):

, *Chlorella* sp., photoperiod, luminosity, lipids.

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. Microalgas	Microalgae	6. _____	_____
2. Chlorella sp	Chlorella sp	7. _____	_____
3. Fotoperiodo	Photoperiod	8. _____	_____
4. Luminosidad	Luminosity	9. _____	_____
5. Lípidos	Lipids	10. _____	_____

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

Las microalgas constituyen una muy buena alternativa para la producción de biocombustibles ya que captan grandes cantidades de CO₂ de la atmosfera, reduce las emisiones de CO₂ y no ponen en riesgo la seguridad alimentaria, en este sentido se evaluó el efecto del fotoperiodo y la luminosidad en el crecimiento y producción de lípidos de *Chlorella* sp., bajo condiciones de laboratorio, aislando la cepa mediante diluciones seriadas, se cultivaron en fotobiorreactores de 3 L de capacidad, con aireación constante, variando la intensidad lumínica (1000 y 2000 lux) y el fotoperiodo (12:12 y 24 luz), se evaluó el crecimiento poblacional con cámara de neubauer por el método de hematocitómetro, se cuantificó clorofila por el método de Arnon (1949), se estimó el peso seco de la biomasa y con ello se determinó la cantidad de lípidos acumulados en las



CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSION	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	3 de 4
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

microalgas, encontrando que durante la fase de crecimiento exponencial, los tratamientos que recibieron fotoperiodo 24:0 presentan densidades más altas, sin embargo, durante la fase estacionaria las densidades más altas se registraron en los tratamiento con fotoperiodo 12:12, además al aumentar la intensidad lumínica y el fotoperiodo a 24 horas de luz se obtiene la mayor cantidad de lípidos (%).

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Microalgae are a very good alternative for the production of biofuels since they capture large amounts of CO₂ from the atmosphere, reduce CO₂ emissions and do not generate food safety at risk. In this sense, the effect of photoperiod and luminosity was evaluated in The growth and production of lipids of *Chlorella* sp., under laboratory conditions, isolating the strain through in dilutions, were cultivated in photobioreactors of 3 L capacity, with constant aeration, varying the light intensity (1000 and 2000 lux) and the photoperiod (12 : 12 and 24 light), the population growth was evaluated with a Neubauer chamber by the hematocytometer method, chlorophyll was quantified by the method of Arnon (1949), the dry weight of the biomass was estimated and the amount of lipids accumulated in the microalgae, finding that during the exponential growth phase, the treatments that received 24: 0 photoperiod present higher densities, nevertheless, during the stationary phase the highest densities were recorded in the 12:12 photoperiod treatments, to increasing the light intensity and the photoperiod in 24 hours of light, the highest amount of lipids was obtained (%).



CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSION	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	4 de 4
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

APROBACION DE LA TESIS

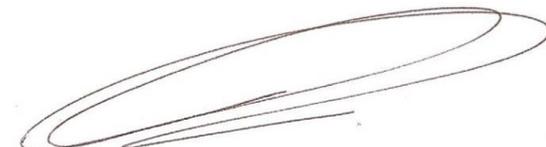
Nombre Presidente Jurado: Luz Marina Botero Rojas

 Firma:

Nombre Jurado: Luz Marina Botero Rojas

 Firma:

Nombre Jurado: Ruben Dario Valbuena Villareal

 Firma:

**Fotoperiodo e intensidad lumínica en la producción de lípidos a partir de *Chlorella sp.*,
como fuente potencial para la obtención de biodiesel**

Jeniffer Rivas Aviléz

Código: 20151138729

Universidad Surcolombiana

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ingeniería y Gestión Ambiental

Neiva, Colombia

19 de agosto de 2021

**Fotoperiodo e intensidad lumínica en la producción de lípidos a partir de *Chlorella* sp.,
como fuente potencial para la obtención de biodiesel**

Jeniffer Rivas Aviléz

Código: 20151138729

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar por el título de:

Magister en Ingeniería y Gestión Ambiental

Director: Ph.D., Eduardo Pastrana Bonilla

Universidad Surcolombiana

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ingeniería y Gestión Ambiental

Neiva, Colombia

19 de agosto de 2021

Dedicatoria

A mi valiente, a mi pedacito, a mi Tin, a lo más importante en mi vida por siempre, a la razón de mi felicidad, de mi esfuerzo, de mis ganas por darte lo mejor.

Tu existencia me hizo encontrar el lado dulce de la vida, fuiste mi motivación más grande para concluir este proyecto de tesis.

A mi hijo Valentín Amórtegui Rivas

“Eres la manera que tiene el mundo para decirme lo bonita que es la vida”

A Valeria Collazos Rivas y Emilia Collazos Rivas, mis sobrinas, mis grandes amores, que con su alegría, su cariño y sus manifestaciones de amor son una gran bendición de Dios para nuestra familia, que nunca permitan que les pongan límites para lograr sus sueños y que luchan día a día por ser felices y por todo lo que anhelan en su corazón, siempre serán nuestro mayor orgullo y felicidad.

A mis padres Luis Alberto Rivas y Rubiela Avilés por su eterno apoyo y ayuda no solo en el desarrollo de esta investigación, sino de todo lo que he necesitado siempre, a mi padre por ser un ejemplo a seguir y a mi madre por su tenacidad y persistente motivación para culminar este trabajo de investigación.

Agradecimientos

A mi asesor el Dr. Eduardo Pastrana Bonilla, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su orientación, por confiar en mí, por su paciencia y su calidad humana.

Al Dr. Rubén Darío Valbuena Villareal, director de la Estación Experimental Surcolombiana de Recursos Hidrobiológicos-ESRH, por permitirme desarrollar este trabajo en las instalaciones de la estación, por el material y el equipo suministrado el cual se me facilitó ilimitadamente.

Al personal de la estación Experimental Surcolombiana de Recursos Hidrobiológicos-ESRH, Karen Quintero, Over Noriega, especialmente a Angélica María Otero por su infinita paciencia, su buena actitud y el cariño con el que comparte todos sus conocimientos y a Beatriz Elena Zapata Berruecos, una mujer a la que admiro y respeto profundamente, gracias por ser una guía en todo el proceso de consolidación, formación y desarrollo de este trabajo, por sus enseñanzas, por su paciencia, por su empatía, por sus oportunos regaños, por no dejarme desfallecer, pero sobre todo por su valiosa amistad.

A mis jurados, la Dra. Luz Marina Botero Rojas y el Dr. Rubén Darío Valbuena Villareal por sus aportes en la consolidación de este trabajo de investigación.

A mis hermanas Adriana Rivas Avilez y Katherine Rivas Avilez por ser siempre mi apoyo, por estar para mí en cada momento de mi vida, por nunca dejarme sola, por sus sabios consejos, por enseñarme y recordarme constantemente que la familia es lo más importante y que a pesar de la distancia siempre estaremos unidas, pero sobre todo por ser mi orgullo y mi ejemplo a seguir.

Tabla de Contenido

Tabla de Contenido	5
Lista de tablas	7
Tabla de figuras.....	8
Introducción	9
1. Planteamiento del problema	12
2. Objetivos.....	15
Objetivo general	15
Objetivo específico.....	15
3. Justificación	16
4. Marco teórico.....	18
Combustibles fósiles	18
Biocombustibles	18
Biodiesel.....	20
Generalidades de las algas.....	21
Producción de microalgas	22
Factores que afectan la producción de lípidos en las microalgas.....	23
Fotoperiodo	26
Intensidad lumínica	27

5. Metodología.....	29
Análisis de Datos	35
6. Resultados.....	36
Discusión.....	43
7. Conclusiones.....	48
8. Referencias	49

Lista de tablas

Tabla 1 Acumulación de lípidos de algas dulce acuícolas. Tomado de Arias et al. (2013).; **Error!**

Marcador no definido.

Tabla 2 Tratamientos experimentales32

Tabla 3 Promedio \pm SD de los parámetros de calidad medidos durante el tiempo del ensayo.36

Tabla 4 Promedio \pm SD de los parámetros evaluados en *Chlorella* sp., a los 37 días de ensayo en laboratorio para los dos factores evaluados (Intensidad lumínica y Fotoperiodo). Se presenta las probabilidades para el análisis de varianza ANOVA de dos factores a un nivel de significancia $p < 0.05$38

Tabla 5 Comparación de la densidad celular a los 9 días, 37 días y el contenido de lípidos en cepas de *Chlorella* sp.44

Tabla de figuras

Figura 1 Diseño de las unidades experimentales.	31
Figura 2. Curva de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. cultivadas sobre condiciones de luz blanca en intensidades de luz 1000-2000 y 4000-5000 lux (Factor 1) y fotoperiodos 12h luz - 12h oscuridad y 24 h luz – 0 h oscuridad (Factor 2). Valores presentados como promedio \pm desviación estándar de la densidad algal (cel/ml).	37
Figura 3. Comportamiento de la clorofila-a durante el ensayo sobre condiciones de luz blanca en intensidades de luz IL: 1000-2000 y 4000-5000 lux (Factor 1) y fotoperiodos 12h luz - 12h oscuridad y 24 h luz – 0 h oscuridad (Factor 2). Valores presentados como promedio \pm desviación estándar de los valores medidos de clorofila-a (mg/L).	39
Figura 4. Comportamiento de la tasa de crecimiento diaria durante el ensayo sobre condiciones de luz blanca en intensidades de luz IL: 1000-2000 y 4000-5000 lux (Factor 1) y fotoperiodos 12h luz - 12h oscuridad y 24 h luz – 0 h oscuridad (Factor 2). Valores presentados como promedio \pm desviación estándar de los valores de la Tasa de crecimiento diaria de <i>Chlorella</i> sp.	40
Figura 5 Promedio \pm desviación estándar del porcentaje de Lípidos (% peso Seco) en muestra seca para los dos factores evaluados (Factor 1: intensidad lumínica y Factor 2: Fotoperíodo). Diferencias entre letras (a, b) indican diferencias significativas entre los tratamientos según el test de Tukey ($p < 0,05$).	41
Figura 6. Interacción de los factores evaluados intensidad lumínica y el fotoperiodo en la producción de lípidos en <i>Chlorella</i> sp.	42

Introducción

Como respuesta a la crisis que se ha generado por el impacto ambiental y los costos del petróleo, ha surgido la necesidad de buscar alternativas que, sin dejar de ser eficientes para el uso de medios de transporte teniendo en cuenta que este abarca alrededor del 73.3% del consumo global de petróleo, contribuyan responsablemente a la conservación al medio ambiente (Balat y Balat, 2010).

La producción de combustibles a partir de fuentes renovables, ha aumentado considerablemente en los últimos años. El uso de biocombustibles tiene varios objetivos y se fundamenta en la necesidad de garantizar el abastecimiento energético de los países, disminuir su dependencia de los combustibles fósiles, adicional a los beneficios sociales, ambientales y económicos que se pueden obtener con la generación de empleos permanentes, el fortalecimiento del sector agrícola y de las economías regionales, el desarrollo agroindustrial, el mejoramiento de la calidad del aire que respiramos y la sustitución de cultivos ilícitos, entre otros beneficios (Ministerio de Minas y Energías, 2009; Marín y Correa, 2020).

Con el fin de evitar la importación de petróleo en tiempos en que la producción nacional no es suficiente para compensar la demanda nacional, los biocombustibles son la única alternativa de conservar una independencia energética necesaria para el desarrollo.

Teniendo en cuenta las dificultades generadas por la necesidad del uso de la energía fósil, en los últimos años se ha puesto en marcha el diseño y la implementación de tecnologías para suplir dicha necesidad de forma responsable con el medio ambiente, como es el caso de los biocombustibles (Queiroz et al., 2015). Las microalgas constituyen una fuente para la obtención de biocombustibles, ya que por medio de la energía solar producen materia orgánica, su crecimiento es acelerado y su composición bioquímica puede variar cambiando las condiciones

ambientales y los nutrientes de cultivo, lo que permite que puedan acumular mayor cantidad de lípidos para que sean aprovechados en la producción de biodiesel (Montoya, 2021).

El contenido lipídico de las microalgas varía dependiendo tanto de la especie como también de sus condiciones de cultivo, Castellanos et al., 2019 estiman que la acumulación de lípidos puede variar entre un 5 y un 70% con relación a su peso seco, según algunas condiciones de cultivo como el estrés nutricional o cambios ambientales (salinidad, pH, temperatura, intensidad lumínica, fotoperiodo, etc.).

Las microalgas son útiles en procesos de biorremediación, para remover metales pesados y materia orgánica, gracias a que su pared celular tiene componentes que contribuyen a su capacidad de retención de contaminantes del agua (Infante *et al*, 2012). También suelen ser de gran valor para la alimentación humana, la fabricación de fertilizantes, gomas industriales, cosméticos, compuestos medicinales, biocombustibles, entre otros.

Una de las principales características de las microalgas es convertir la energía lumínica, en energía química de forma más eficiente que las plantas, además de la capacidad que tienen para crecer en cualquier ambiente, y ser termoadaptables les confiere ciertas características que las convierten en una fuente importante de biomoléculas y metabolitos aprovechables industrialmente sobre todo para la generación de energía (Subia y Rubio, 2018).

Se ha demostrado a nivel de laboratorio que las microalgas tienen potencial para la producción de biodiesel (Arias et al, 2013), sobretodo en ciertas condiciones de cultivo que regulan su crecimiento, promoviendo la acumulación de lípidos como las fuentes de carbono, ya sea orgánica (glucosa, acetato, glicerol, fructosa, entre otras) o inorgánica (CO₂) (Huang et al., 2010) y la energía lumínica en términos de fotoperiodo, calidad (longitud de onda) e intensidad.

Por otra parte, para el crecimiento de las microalgas y para potencializar sus aplicaciones industriales se deben tener en cuenta la disponibilidad de nutrientes, calidad e intensidad de la energía lumínica suministrada al medio, temperatura, salinidad, *pH*. Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del fotoperiodo y la luminosidad en el crecimiento y producción de lípidos en *Chlorella* sp., bajo condiciones de laboratorio.

1. Planteamiento del problema

La base de todos los sectores económicos (agricultura, industria y servicios) es la energía y esta demanda energética que aumenta gradualmente, ha sido suplida en gran parte por el petróleo, sin embargo, este recurso es un combustible fósil y de alto costo (Pasquevich, 2010). Con la utilización de estos combustibles, el hombre generó un cambio revolucionario en las tecnologías utilizadas, sin embargo, su uso constante trajo consigo consecuencias altamente nocivas para el medio ambiente. La combustión de este recurso natural genera un alto grado de acumulación de CO₂ (Serna et al., 2011) uno de los principales gases que provocan el efecto invernadero en la atmósfera (Brennan y Owende, 2010).

Los gases con efecto invernadero representan alrededor de 1% de la atmósfera e impiden que parte del calor sea liberado de la tierra. Por lo tanto, sin este efecto; la temperatura de la tierra sería 30°C más baja, y la vida no se vería como la conocemos (Chauvet y González, 2008). Sin embargo, un aumento desmedido de estos gases es sumamente perjudicial para el planeta y por ende para la vida que en él se desarrolla. El calentamiento de la superficie terrestre ha aumentado más de 0.6 °C desde los últimos 100 años.

De acuerdo con la Comisión Marco de Naciones Unidas para el Cambio Climático (CMNUCC) 2010, el factor de aumento de temperatura se origina en un proceso de industrialización que inició hace un siglo y medio y, particularmente, por un incremento en la combustión de petróleo, gasolina y carbón, así como la tala de bosques y algunos métodos inadecuados de explotación agrícola.

Como respuesta a la crisis que se ha generado por el impacto ambiental y los costos del petróleo, ha surgido la necesidad de buscar alternativas que, sin dejar de ser eficientes para el uso

de medios de transporte, teniendo en cuenta que este abarca alrededor del 73.3% del consumo global de petróleo, contribuyan responsablemente a la conservación al medio ambiente (Balat y Balat, 2010). La producción de combustibles a partir de fuentes renovables, ha aumentado considerablemente en los últimos años.

El uso de biocombustibles tiene varios objetivos y se fundamenta en la necesidad de garantizar el abastecimiento energético de los países, disminuir su dependencia de los combustibles fósiles, adicional a los beneficios sociales, ambientales y económicos que se pueden obtener con la generación de empleos permanentes, el fortalecimiento del sector agrícola y de las economías regionales, el desarrollo agroindustrial, el mejoramiento de la calidad del aire que respiramos y la sustitución de cultivos ilícitos, entre otros beneficios (Ministerio de Minas y Energías, 2009).

Con el fin de evitar la importación de petróleo en tiempos en que la producción nacional no es suficiente para compensar la demanda nacional, los biocombustibles son la única alternativa de conservar una independencia energética necesaria para el desarrollo. Teniendo en cuenta las dificultades generadas por la necesidad cada vez mayor y el uso de la energía fósil se ha visto la necesidad de implementar tecnologías para suplir dicha necesidad de forma responsable con el medio ambiente y renovable, como es el caso de los biocombustibles (Queiroz., *et al*, 2015). Estos proceden generalmente del azúcar, trigo, maíz o semillas oleaginosas, sin embargo, para el caso del biodiésel, las microalgas constituyen una muy buena alternativa ya que captan grandes cantidades de CO₂ de la atmósfera, reduce las emisiones de CO₂, además no pone en riesgo la seguridad alimentaria como sucede con el uso de otras fuentes de materia prima ya que no requieren terrenos fértiles ni agua de buena calidad, ni pesticidas para crecer.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué efecto tiene el fotoperiodo y la intensidad lumínica en la producción de lípidos a partir de *Chlorella* sp., como fuente potencial para la obtención de biodiesel?

2. Objetivos

Objetivo general

- ✓ Evaluar el efecto del fotoperiodo y la luminosidad en el crecimiento y producción de lípidos en *Chlorella* sp bajo condiciones de laboratorio.

Objetivo específico

- ✓ Establecer las principales variables de crecimiento asociadas a la producción de biomasa en *Chlorella* sp., sometida a los diferentes tratamientos experimentales.
- ✓ Cuantificar el porcentaje de lípidos presentes en *Chlorella* sp., sometidas a los diferentes tratamientos experimentales.

3. Justificación

El uso excesivo y la dependencia de los recursos fósiles como fuentes principales de energía ha generado la necesidad de buscar opciones que suplan los requerimientos energéticos y que no tengan efectos nocivos para el medio ambiente. En los últimos años ha tomado gran importancia el estudio de todas aquellas técnicas que optimicen los procesos de obtención de biocombustibles para que estos sean energéticamente productivos y económicamente viables.

Los biocombustibles, son combustibles de origen biológico, que se obtienen de una biomasa, resultante de la conversión de energía solar en energía química mediante el proceso de fotosíntesis que posteriormente por medio de combustión liberan energía en forma de calor (García et al, 2013).

El término biomasa abarca un conjunto muy heterogéneo y variado de materia orgánica y se emplea para denominar a una fuente de energía basada en la transformación de la materia orgánica de origen animal y vegetal, así como también toda materia orgánica de la que se pueda obtener energía con excepción de los combustibles fósiles y sus derivados.

El principal objetivo de los biocombustibles es contribuir a la minimización de los impactos ambientales como el calentamiento global y disminuir la presión existente sobre los yacimientos petrolíferos que son las fuentes de los combustibles que se utilizan hoy en día y que son finitos (Valdez, 2009).

A nivel mundial algunos países como Brasil, China, Japón y la Unión Europea, tienen políticas nacionales de uso del biodiesel, han contribuido al auge de los biocombustibles como energía renovable, estas nuevas alternativas han generado alianzas entre diversos países como es el caso de la inversión de empresas del Japón en el sector productivo Brasileño, esto con la

firme intención de desarrollar cultivos y tecnologías que contribuyan la disminución del precio final del Biodiesel y de ésta manera poder importar productos de calidad a un precio inferior (Serna et al, 2011).

Las microalgas constituyen una muy buena alternativa para la producción de biocombustibles ya que captan grandes cantidades de CO₂ de la atmosfera, reduce las emisiones de CO₂ y no ponen en riesgo la seguridad alimentaria. Las investigaciones que se han realizado en la producción de biodiesel a partir de microalgas abarcan más de 20 años, dichas investigaciones se han realizado tanto desde el sector privado hasta aquellos que se dedican a la academia y la investigación, pues se ha demostrado que algunas especies de algas tienen un gran potencial para la producción del biocombustible (Castillo et al., 2017).

Este proyecto de investigación pretende aportar elementos para la generación de energías alternativas, particularmente en la acumulación de aceites de microalgas con potencial para la producción de biodiesel, que permita contribuir favorablemente con el medio ambiente y crear desde el contexto local, de la ciudad de Neiva y desde el contexto regional desde el Departamento de Huila, conciencia sobre el uso excesivo de combustibles fósiles y la necesidad de aportar a la conservación del medio ambiente.

4. Marco teórico

Combustibles fósiles

Los combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural), son el resultado de la acción entre bacterias y la presión interior de la tierra sobre la materia orgánica en proceso de descomposición durante siglos. Estos combustibles son una fuente de energías no renovables ya que existen en la naturaleza en una cantidad limitada. Han suplido los requerimientos energéticos mundiales desde la época de la industrialización; de hecho, en las últimas décadas el petróleo, el carbón y el gas natural han sido los combustibles más utilizados y en mayor cantidad (Salaet y Roca, 2010).

Como consecuencia del uso y abuso de los combustibles fósiles han surgido dos grandes preocupaciones, en primera medida los impactos ambientales que generan su uso, tanto para el aire generando emisiones de gases con efecto invernadero, como también para la tierra y el agua, pues al momento de realizar perforaciones, extracciones, procesamiento e incluso el transporte de las materias primas se hace uso de estos recursos y además de gastarlos los contamina con los desechos tóxicos que estos generan (Aries, 2006). También es de gran preocupación y un tema de amplio debate el agotamiento de las reservas de dichos recursos y por ende la tendencia del aumento de sus precios.

Biocombustibles

Según Schallenberg et al. (2008), los biocombustibles o energías renovables son aquellas que se producen de forma continua y son inagotables, puesto que se renuevan continuamente a diferencia de los combustibles fósiles, de los que existen unas determinadas cantidades o

reservas, agotables en un plazo más o menos determinado. Las principales formas de energías renovables que existen son: la biomasa, hidráulica, eólica, solar, geotérmica y las energías marinas. Las energías renovables provienen, de forma directa o indirecta, de la energía del solar; constituyen una excepción la energía geotérmica y la de las mareas.

Para el caso particular de Colombia, la idea de la utilización de los biocombustibles ha venido evolucionando con el apoyo de la adopción de decretos de ley que permiten la introducción de biocombustibles, mezclados con combustibles fósiles como la gasolina y el diésel. Esta acción está apoyada en normas que obligan a implementar una mezcla gradualmente en el territorio nacional, y que podrá impulsar la producción de materias primas y la producción de alcohol carburante y biodiesel. El Gobierno nacional, mediante la expedición de la Ley 693 de 12 de septiembre de 2001, estableció que a partir del año 2005 la gasolina colombiana debería tener elementos oxigenados que disminuyeran las emisiones nocivas, en esta ley se propone el uso de una mezcla de 90 % gasolina y 10 % etanol (Pérez, Delgado y Salgado, 2015).

De igual manera, hay otros instrumentos jurídicos para aprovechar los medios energéticos con baja contaminación atmosférica como lo son el CONPES 3510, leyes 693 de 2001, Ley 993 de 2004, entre otros. Por su parte, especificados en las resoluciones sobre la calidad de diésel y gasolina, se destacan las resoluciones 1180 de 2006 y 90963 de 2014. (Ramírez y Rodríguez, 2019).

En el territorio nacional se destacan plantas de biocombustibles sostenibles del caribe, *BioD*, *Ecodiesel de Colombia* y *Aceites Manuelita* con la mayor producción de biodiésel por día correspondiendo al 73,2 % de la producción total diaria de esta región. Colombia actualmente presenta un déficit de 61 %, lo que significa que existe una demanda para el biodiésel que no está satisfecha. Actualmente la cobertura de la mezcla de diésel fósil con biodiésel al 5 % incluye la

Costa Atlántica, Santander, sur del Cesar, sur y occidente del país, la comercialización de diésel fósil y biodiésel inició en 2009, en los departamentos de Nariño, Cauca, Valle del Cauca, Risaralda, Caldas y Quindío (Perez et al., 2015). Sin embargo, durante el año 2019 el gobierno nacional tomo la decisión del Gobierno de rebajar del 12% al 2% la mezcla de biodiésel en el acpm para el transporte en Colombia, razón por la cual dejó sin mercado a 11 plantas productoras de biodiesel, actualmente la única planta productora de biodiesel que está trabajando es Ecodiesel de Barrancabermeja, la cual entrega el total de su producción a la empresa Ecopetrol (Tovar, 2019).

Según el Ministerio de Minas y Energía (2009), teniendo en cuenta los retos identificados para Colombia en el Consejo Nacional de Política Económica y Social (CONPES) 3510 de 2008, se hace la sugerencia de implementar estrategias que busquen generar las condiciones necesarias para el mejoramiento de la eficiencia productiva de la agroindustria de los biocombustibles, de manera económica, social y ambientalmente sostenible.

Biodiesel

Uno de los grandes retos a los que se enfrenta la humanidad actualmente constituye la sustitución de los combustibles fósiles derivados del petróleo, por combustibles de origen biológico; una de las posibilidades para reemplazar el diésel de petróleo es la producción de biodiesel. El biodiesel es un combustible renovable que se deriva de los aceites vegetales y las grasas animales, con propiedades similares a las del petróleo. Algunas investigaciones han concluido que el uso del biodiesel reduce las emisiones de monóxido de carbono, azufre, hidrocarburos aromáticos y partículas sólidas (Chávez, et al., 2012).

El biodiesel es una mezcla de mono alquil-ésteres que se sintetiza por medio de la transesterificación de aceites y catálisis homogénea básica con alcoholes de cadena corta, que es la reacción química encargada de transformar los glicéridos en ésteres de ácidos grasos de alquilo con presencia de un catalizador con glicerina como subproducto (Chávez et al., 2012). Esto hace al biodiesel muy semejante a las características del diésel común en cuanto a energía calorífica, densidad y viscosidad, y ambos puede ser mezclado en cantidades bajas para ser utilizados sin necesidad de hacer modificaciones en los motores de autos que lo utilizan. Al ser un combustible obtenido de fuentes naturales tiene características que hacen de su uso un mecanismo favorable al medio ambiente (Ministerio de Minas y Energía, 2009).

Los países que han incursionado en la producción de Biocombustibles, se encuentran principalmente en el continente americano y en Europa. Es así como más del 95% del Etanol producido en el mundo es cubierto por América, mientras que Europa le ha apostado en mayor medida a la producción de Biodiesel.

Generalidades de las algas

Las algas son un conjunto de organismos acuáticos pluricelulares (macroalgas) y unicelulares (microalgas); las macroalgas son plantas similares a las terrestres porque necesitan de la luz, poseen raíces, tallos y pigmentos; se encuentran a diferentes profundidades, en aguas dulces, salobres y marinas (Blanco y Alfonso, 2008). Las microalgas son organismos eucariotas fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química con una eficiencia cuatro veces superior a la de las plantas.

La mayor parte de las algas son fotoautótrofas, aunque algunas son heterótrofas facultativas u obligadas; unas cuantas son inclusive fagotróficas. La mayoría de las algas son organismos acuáticos que viven en cuerpos de aguas, es posible encontrar algunas especies que se desarrollan en hábitats tan diversos como troncos de árboles, bancos de nieve, aguas termales o incluso dentro de cavidades diminutas de las rocas del desierto (Marshall, 1987).

Existe una clasificación, sin embargo, ha sido un tema que ha generado mucho debate y discusión teniendo en cuenta la gran diversidad de estos organismos. Los primeros intentos por distinguir grupos separados de algas se basan en la pigmentación, se distinguen los grupos de algas verde azules (cianobacterias), pardas, verdes y rojas (Blanco y Alfonso, 2008).

Las algas verdes presentan una diversidad en su forma corporal, mientras que en otras clases la evolución de esta característica apenas ha avanzado más allá de la etapa unicelular (Marshall, 1987).

Las algas son útiles, por ejemplo, en procesos de biorremediación, para remover metales pesados y materia orgánica, gracias a que su pared celular tiene componentes que contribuyen a su capacidad de retención de contaminantes del agua (Barrios et al., 2012). También suelen ser de gran valor para la alimentación humana, la fabricación de fertilizantes, gomas industriales, cosméticos, medicinales, biocombustibles, entre otros.

Producción de microalgas

En la actualidad las microalgas son consideradas como una gran alternativa para la producción de biodiesel, ya que poseen un gran contenido en lípidos y aceites; además, son fotosintéticamente eficientes, pueden crecer en diferentes ambientes y presentan una alta tasa de

crecimiento. (Castillo et al., 2017). A nivel de laboratorio, se ha demostrado que algunas especies de microalgas poseen un gran potencial para la producción de biodiesel. (Arias et al., 2013).

Según Flores et al., 2003; existen dos tipos de sistemas para la producción de microalgas; los sistemas abiertos, en los que el cultivo está expuesto a la atmosfera, es decir, no hay un control total de los parámetros que afectan el cultivo y son susceptibles a contaminación por invasión de otros microorganismos, además, resultan ser de bajo costo e igualmente de baja productividad.

A los sistemas cerrados se les denominan fotobiorreactores, en los que el cultivo no tiene contacto alguno con la atmosfera, es decir, que con mayor facilidad se controlan todos los parámetros que afectan el cultivo, tales como la intensidad de la luz, la temperatura, nutrientes, entre otros, que facilitan el crecimiento y la acumulación lipídica (Faife, 2012).

Factores que afectan la producción de lípidos en las microalgas

Así, como se ha avanzado en el estudio de los sistemas de cultivo, también se han estudiado varias especies de microalgas y su capacidad para producir lípidos, se considera que la producción a partir de estos microorganismos supera en un 10 y 40 % el valor por la producción de biodiesel a partir del aceite de palma. Es importante tener en cuenta que el contenido lipídico de las microalgas varía de acuerdo a cada especie y a sus condiciones de cultivo, puesto que cuando están sometidas a situaciones de estrés generalmente se produce un aumento en su contenido lipídico, el cual puede estar alrededor del 80% del peso de la biomasa seca y en condiciones normales entre 20 y 50 % (Álvarez, et al., 2012).

Tabla 1

Acumulación de lípidos de algas dulce acuícolas. Tomado de Arias et al. (2013).

Especie	Lípidos (% peso seco)
<i>Chlorella emersonii</i>	63
<i>Chlorella protothecoides</i>	11 – 59
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	27
<i>Chlorella sorokiniana</i>	13 – 23
<i>Chlorella saccharophila</i>	18 – 54
<i>Chlorella</i> sp.	19 – 43
<i>Chlorella vulgaris</i>	15 – 58
<i>Chlorella zofingiensis</i>	51
<i>Haematococcus pluvialis</i>	35
<i>Neochloris oleoabundans</i>	26 – 38
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	31
<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	8 – 12
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10 – 43
<i>Scenedesmus ruvescens</i>	27 – 43
<i>Scenedesmus</i> sp.	7 – 53

El análisis de las características del desarrollo estacional y espacial de las algas debe enmarcarse dentro de una dinámica de relaciones entre los parámetros ambientales y las características fisiológicas de los organismos (Oroná, 2012). Es importante un estudio detallado

de los factores que regulan el crecimiento y la acumulación de lípidos para maximizar la producción de biodiesel.

Teniendo en cuenta que las algas son organismos fotosintéticos necesitan para obtener energía química una fuente de carbono, ya sea orgánica (glucosa, acetato, glicerol, fructosa, entre otras) o inorgánica (CO₂) (Huang et al., 2010). En fases oscuras las algas utilizan exclusivamente compuestos orgánicos como fuente de energía mientras que, en ausencia de oscuridad, toman su energía tanto de fuentes orgánicas como inorgánicas y captan la energía de la luz.

Cada especie responde de forma diferente a cada una de las condiciones del cultivo, la *Chlorella* sp., responde favorablemente en la acumulación de lípidos cuando en las condiciones de cultivo los nutrientes se agotan (nitrógeno, potasio-fosfato, hierro y los tres combinados), sin embargo, no de todos los tipos de nutrientes, con la disminución del nitrógeno en el cultivo la post-cosecha presenta mayor acumulación de lípidos (Rodolfi et al., 2009).

El crecimiento en las microalgas y la acumulación de lípidos están directamente relacionados con la composición y las condiciones del medio de cultivo. Para la obtención de una gran cantidad de biomasa es necesario que el medio de cultivo sea rico en nitrógeno, pero para que la obtención de lípidos se maximice es indispensable que el medio de cultivo tenga una cantidad de nitrógeno limitado (Yeh y Chang, 2012).

Fotoperiodo

El fotoperiodo resulta ser un factor importante que afecta el ciclo de vida y por ende el metabolismo de las microalgas, este consiste en la exposición a periodos de luz y oscuridad de los organismos (Vásquez et al., 2017).

Aunque naturalmente las microalgas se adaptan a los periodos de luz y oscuridad del día, a nivel de laboratorio, los cultivos están sometidos a iluminación constante, ya que al ser organismos fotosintéticos la presencia de luz favorece la división celular en ciertas microalgas; las más destacadas según Villa, et al., 2014 son: *Isochrysis*, *nannochloropsis*, *Chlorella*, *netraselmis*, *Dunaliella*, *rhodomonas*, *Pavlova*, entre otros.

Estos investigadores analizaron el efecto del fotoperiodo en una especie de diatomea y establecieron que la velocidad de crecimiento de las microalgas se redujo significativamente en ciclos de 10:14, 6:18, 0:24 horas (luz: oscuridad), produciendo una biomasa en menor cantidad con respecto al fotoperiodo 24:0 horas (luz: oscuridad).

El régimen de luz es fundamental en el crecimiento y producción de biomasa en los cultivos, los cultivos con fotoperiodo 12 horas luz: 12 horas oscuridad tienen un crecimiento menor con respecto a los cultivos expuestos a iluminación continua, la diatomea *Thalassiosira pseudonana* mostraron una mayor tasa de crecimiento con luz continua, en la mayoría de las microalgas el crecimiento se lleva a cabo durante el periodo de luz debido a que durante la fotosíntesis generan la energía que necesitan para el proceso de división celular el cual se da en el periodo de oscuridad, sin embargo la división celular también sucede en la luz continua, razón por la cual el crecimiento muestra mayor índice en presencia de luz continua (Lopez et al., 2009).

Por otra parte, Ferrero (2011), afirma que aproximadamente la biomasa de microalgas producida, se genera durante las horas de irradiación, mientras que durante los periodos de oscuridad el crecimiento es mínimo o tiende a desaparecer a causa del consumo energético de la respiración celular. De igual manera afirma que no solo incide el fotoperiodo en la división celular de las microalgas, así como también la intensidad de la radiación durante los periodos de luz presentan un efecto en el crecimiento; además, en los periodos de oscuridad la temperatura puede disminuir y ocasionando una disminución en la formación de la misma.

Intensidad lumínica

La luz se debe considerar en términos de fotoperiodo, calidad (longitud de onda) e intensidad, además de su importancia como fuente de energía para realizar su proceso de fotosíntesis, el hecho de que la luz fluctúe considerablemente tanto en espacio (profundidad y latitud) como en tiempo (diaria y estacionalmente) sugiere que con frecuencia es un factor limitante para el crecimiento del fitoplancton (Marshall, 1987).

Teniendo en cuenta que las algas son organismos fotosintéticos, requieren de la suficiente luz para que su crecimiento poblacional sea mayor, en exceso de luz se puede presentar una fotoinhibición, además de la disminución del contenido lipídico y en condiciones de baja de intensidad de luz se presenta un lento crecimiento lineal, independientemente de la presencia de nutrientes como el nitrógeno (Solovchenko et al., 2007).

La relación que se encuentra entre la densidad celular de los cultivos de *Isochrysis galbana*, el pH y la intensidad lumínica puede ser explicada por tres sucesos: 1) La actividad fotosintética hace disminuir la concentración de CO₂ en el medio lo que hace que el sistema tampón CO₂ / HCO₃⁻ se altere y se incremente el pH. 2) La absorción del nitrógeno necesario

para el crecimiento de las microalgas resulta en un incremento del pH del medio. 3) La luz induce el aumento en la toma de protones por parte de los cloroplastos, alcalinizando el medio (Velasco et al., 2009).

5. Metodología

1. Localización y descripción del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de producción de alimento vivo de la Estación Experimental Surcolombiana de Recursos Hidrobiológicos ESRH. Esta se ubica dentro del predio “La Granja Experimental”, propiedad de la Universidad Surcolombiana, vereda San Miguel del municipio de Palermo-Huila, situada a 461 m.s.n.m., a siete (7) Km de la ciudad de Neiva, dentro del área que cubre el distrito de adecuación de tierras de mediana escala Juncal. Esta zona presenta una temperatura ambiental promedio de 28.6 °C y está ubicado geográficamente en los 2°53’10.5” LN 75°18’22.8” LO.

2. Producción microalgal

Obtención de cepas

Siguiendo la metodología desarrollada por Aguilar et al. (2011), se realizaron diluciones seriadas 1:9 ml para aislar la cepa, se tomó 1 ml de la muestra de agua de los estanques de la ESRH y se agregó a un tubo de ensayo que contenía 9 ml del medio de cultivo 15-15-15 NPK, se homogenizó y luego se agregó 1 ml a un segundo tubo con 9 ml de medio, así se realizó durante dos semanas mientras se realizaban observaciones con ayuda de un microscopio binocular Carl Zeiss, en aumentos de 40 y 100X para determinar la presencia de las microalgas.

En aquellos medios de cultivo en los que se observaron microalgas, se sembraron con asa metálica en cajas de Petri enriquecido con medio de cultivo F/2, este cultivo sólido se mantuvo a una temperatura controlada de 25 °C y expuesto a la luz en fotoperiodo 24:0 horas. Este

procedimiento se realizó por triplicado con colonias del inóculo, las microalgas que se aislaron se mantuvieron en medio de cultivo líquido 15-15-15 NPK y sólido en F/2 de Guillard en cajas de Petri (Hernández y Velasco, 2014).

3. Unidades experimentales

El cultivo de microalgas se realizó en fotobiorreactores (erlenmeyer de vidrio de 5 litros de volumen útil), los cuales contaban con un tapón de plástico que tenía un orificio para permitir el paso de la aireación.

Los fotobiorreactores se ubicaron en un estante metálico de 4 niveles para 4 tratamientos, cada uno con 4 réplicas, por cada nivel del estante se adaptaron dos lámparas de luz blanca led en intervalos de 1000 a 2000, y de 4000 a 5000 lux, el estante fue cubierto con una tela de color negro elaborada para cubrirlo completamente, los tratamientos que tenían fotoperiodo 24:0 horas se dejaban en el estante directos a luz de las lámparas, los tratamientos que tenían fotoperiodo 12:12 horas se cubrían con una caja de cartón diseñadas a la medida de los fotobiorreactores las cuales estaban cubiertas de papel negro para impedir el paso de la luz durante las horas de oscuridad Figura 1.



Figura 1. Diseño de las unidades experimentales.

4. Seguimiento al cultivo

Los cultivos contaban con aireación constante para evitar la sedimentación celular, con una variación de fotoperiodo 12:12 y 24:0 horas luz/oscuridad, e intensidad lumínica en rangos de 1000-2000 y 4000 -5000 lux, temperatura ambiente controlada de 25°C y con medio de cultivo 15-15-15 NPK. Cada dos días se monitoreaban: intensidad lumínica con un luxómetro

(MASTECH MS6612) y cada 8 días con ayuda de un Spectroquant ® NOVA 60 y un equipo multiparamétrico HACH® HQ40D se determinaba el pH, la temperatura del agua (°C), oxígeno disuelto (mg/L), conductividad (µS/cm) y desechos nitrogenados: nitritos (mg/L), nitratos (mg/L) y amonio (mg/L).

Tabla 2

Tratamientos experimentales

TRATAMIENTO	Factor 1:	Factor 2:
	INTENSIDAD LUMINICA (lux)	FOTOPERIODO (luz: oscuridad)
1	1000 – 2000	12:12
2	1000 – 2000	24:0
3	4000 - 5000	12:12
4	4000 – 5000	24:0

Fuente: Autora, 2021.

5. Parámetros de cultivo

- ✓ Densidad algal

La densidad algal fue determinada mediante recuento en cámara de Neubauer, utilizando el método de hematocitómetro, bajo un microscopio óptico. Para cada réplica el conteo se realizó

por duplicado. Para disminuir el error del método se calculó el promedio de los recuentos y se utilizó la siguiente fórmula (Sipaúba -Tavares et al., 2003):

$$\text{Conteo algal} = \frac{\text{Numero de celulas contadas}}{10 \times 4 \times 10^{-6}}$$

✓ Clorofila A

La determinación de clorofila se realizó por cada réplica de la siguiente manera: se filtraron 30 ml del cultivo y el filtro más la biomasa filtrada fueron macerados en 50 ml de acetona, posteriormente se mantuvieron en oscuridad y refrigeración por 24 horas. Trascorrido este tiempo con una pipeta Pasteur se tomó 5 ml mililitros de esta muestra y se depositó en una cubeta de cuarzo para hacer la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS Biochrom Libra 580 a 663 y 645 nm de longitud de onda.

Finalmente, para conocer la concentración de clorofila (α -a) en mg g^{-1} de peso fresco, se usó la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila } a = 12.78 * A_{663} - 2.69 * A_{645}$$

✓ Tasa de crecimiento diario

Es el incremento logarítmico de la biomasa durante la duración del ensayo, para lo cual se empleó la siguiente fórmula:

$$\mu_{i-f} = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t_f - t_i} \text{ (día}^{-1}\text{)}$$

Donde:

μ_{i-f} = promedio de tasa de crecimiento específico desde el tiempo i a f

X_i = es la biomasa al tiempo i

X_f = es la biomasa al tiempo f

✓ Determinación de lípidos totales

Una vez se alcanzó la etapa estacionaria del cultivo (día 37), la biomasa fue cosechada por centrifugación, se tomaron 200 ml en tubos falcón (cada uno de 50 ml) a 1200 rpm durante 10 minutos, posteriormente se eliminaba el sobrenadante y la biomasa se centrifugó de nuevo con agua destilada a 1200 rpm por de minutos nuevamente.

La biomasa obtenida fue secada en horno durante 24 horas a 60°C y puesta en campana de desecadora para eliminar la humedad sobrante hasta obtener una masa constante para cada unidad experimental, posteriormente una muestra de aproximadamente 0.5 gramos fue utilizada para la determinación del contenido de lípidos por extracción con éter de petróleo a una temperatura de 40-60°C por un periodo de 3 horas (sistema de extracción semiautomático – Soxtec TM 2043).

Análisis de Datos

Se utilizó un diseño experimental factorial (2 x 2) con un arreglo factor intensidad lumínica (1000-2000 lux y 4000-5000 lux) X factor fotoperiodo (12h: 12h y 24h: 0h), para un total de 4 tratamientos cada uno con 4 réplicas para un total de 16 unidades experimentales (fotobiorreactores). Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza de dos factores con un nivel de significancia ($P < 0.05$). Las variables respuesta analizadas fueron la densidad algal, clorofila-a, la tasa de crecimiento diaria y la cantidad de lípidos obtenidos por tratamiento experimental, estos valores son reportados como el promedio \pm desviación estándar. En el caso donde existieron diferencias significativas entre los tratamientos, se usó la prueba a posteriori de Tukey (> 0.05) para establecer las diferencias 1:1 en los tratamientos. Antes de realizar los análisis de varianza fueron verificados los supuestos de normalidad mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Bartlett. Para los análisis estadísticos se utilizó el software R Core Team (2021).

6. Resultados

Los parámetros de calidad de agua que fueron medidos durante el ensayo no presentaron variaciones entre los diferentes tratamientos a lo largo del ensayo (37 días), estas variaciones mínimas en la calidad del agua garantizaron la homogeneidad durante el ensayo (Tabla 2).

Tabla 3

Promedio \pm SD de los parámetros de calidad medidos durante el tiempo del ensayo.

Factor 1	Factor 2:	Temperatura ambiente (°C)	Temperatura del agua (°C)	pH	Conductividad (μS/cm)	Oxígeno disuelto (mg/L)	Nitritos (mg/L)	Nitratos (mg/L)	Amonio (mg/L)
1000-2000 lux	12h:12h	25,1 \pm 1,3	23 \pm 1,4	5,6 \pm 1	1411 \pm 49	8,27 \pm 0,3	0,17 \pm 0,2	19,33 \pm 13,27	1,75 \pm 0,7
lux	24h:0h	25,2 \pm 1,6	23,1 \pm 1,2	4,5 \pm 1,4	1408 \pm 75	8,24 \pm 0,3	0,15 \pm 0,2	24,27 \pm 2,4	2,41 \pm 1,0
4000-5000 lux	12h:12h	23,6 \pm 1,	22,1 \pm 1,4	5,4 \pm 1,1	1357 \pm 34	8,35 \pm 0,3	0,17 \pm 0,2	21,25 \pm 14,83	2,61 \pm 0,4
lux	24h:0h	23,3 \pm 1,83	22,3 \pm 1,4	4,3 \pm 1,4	1391 \pm 137	8,37 \pm 0,4	0,14 \pm 0,2	35,27 \pm 0,8	2,53 \pm 0,3

Fuente: Autora, 2021.

En general, el crecimiento medido como densidad algal, en los resultados del presente trabajo permiten observar que hasta el día 5 se da una fase de crecimiento en ajuste, que luego hasta el día 21 se da un crecimiento con una forma exponencial y finalmente hasta el día 37 llegamos a una forma de crecimiento estacionaria (Figura 2). Sin embargo, se observa

diferencias significativas en la densidad algal al final del ensayo a los 37 días para el factor fotoperiodo ($P < 0,001$) (Tabla 3), donde los tratamientos que recibieron un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad se observó densidades mayores a 80 (cel/ml $\times 10^5$) y los tratamientos que recibieron 24 horas de luz se registró densidades cercanas a las 60 (cel/ml $\times 10^5$) (Figura 2). La evaluación de la interacción entre los dos factores (intensidad lumínica y fotoperiodo) para la densidad algal fue no significativa ($p = 0,894$), lo que indica que estos dos factores evaluados no se cruzan y por el contrario sus respuestas son independientes.

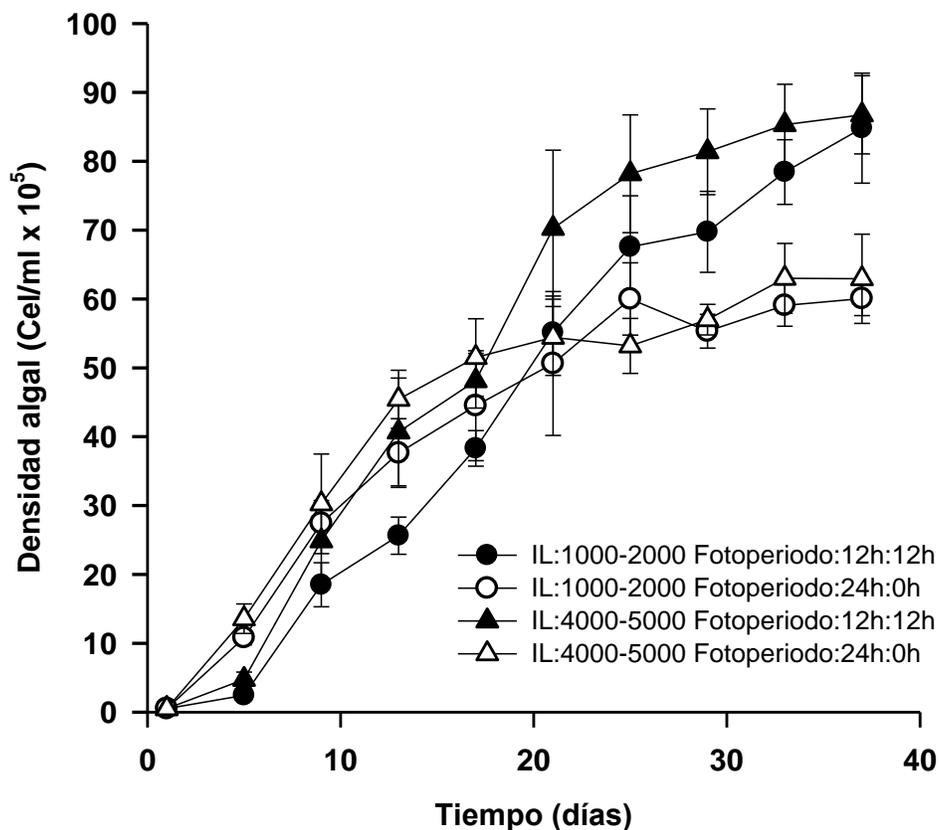


Figura 2. Curva de crecimiento de *Chlorella* sp., cultivadas sobre condiciones de luz blanca en intensidades de luz 1000-2000 y 4000-5000 lux (Factor 1) y fotoperiodos 12h luz - 12h oscuridad y 24 h luz - 0 h oscuridad (Factor 2). Valores presentados como promedio \pm desviación estándar de la densidad algal (cel/ml).

En cuanto al comportamiento de la clorofila- α , se observó un aumento exponencial hasta el día 17, seguido de una fase estacionaria (Figura 3). Sin embargo, al final del ensayo (día 37), los tratamientos del factor intensidad lumínica 4000-5000 lux presentaron los valores más altos de la clorofila- α y el valor más bajo el tratamiento intensidad lumínica 1000-2000 lux en fotoperiodo 12 horas luz – 12 horas oscuridad. De esta manera, se encontraron diferencias significativas para el factor 1 Intensidad lumínica ($p=0,0007$), pero no se observaron diferencias para el factor 2 fotoperiodo ($p=0,1239$), ni la interacción fue significativa ($p=0,0831$).

Tabla 4

Promedio \pm SD de los parámetros evaluados en Chlorella sp., a los 37 días de ensayo en laboratorio para los dos factores evaluados (Intensidad lumínica y Fotoperiodo). Se presenta las probabilidades para el análisis de varianza ANOVA de dos factores a un nivel de significancia $p<0.05$.

Factor 1: Intensidad lumínica	Factor 2: Fotoperíodo	Densidad algal (cel/ml) *10⁵	Clorofila-α ($\mu\text{g/L}$)	Tasa de crecimiento diario	% Lípidos
1000-2000 lux	12h:12h	84 \pm 7,98 a	10,82 \pm 1,38 a	0,013 \pm 0,017 a	0,92 \pm 0,64 ab
	24h:0h	60 \pm 2,5 b	13,93 \pm 1,17 ab	0,003 \pm 0,010 a	0,74 \pm 0,27 a
4000-5000 lux	12h:12h	87 \pm 5,6 a	16,39 \pm 2,20 b	0,003 \pm 0,001 a	0,37 \pm 0,19 a
	24h:0h	63 \pm 6,4 b	16,19 \pm 1,06 b	0,0001 \pm 0,006 a	1,40 \pm 0,40 b
Anova de dos factores					
Factor 1: Intensidad Lumínica		0,501	0,0007*	0,2527	0,584
Factor 2: Fotoperíodo		0,000*	0,1239	0,7041	0,005*
Interacción Factor 1 x Factor 2		0,894	0,0831	0,3017	0,0004*

* indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

a,b diferencias en las letras indican entre los factores indican diferencias significativas según el test a posteriori de Tukey. Fuente: Autora, 2021.

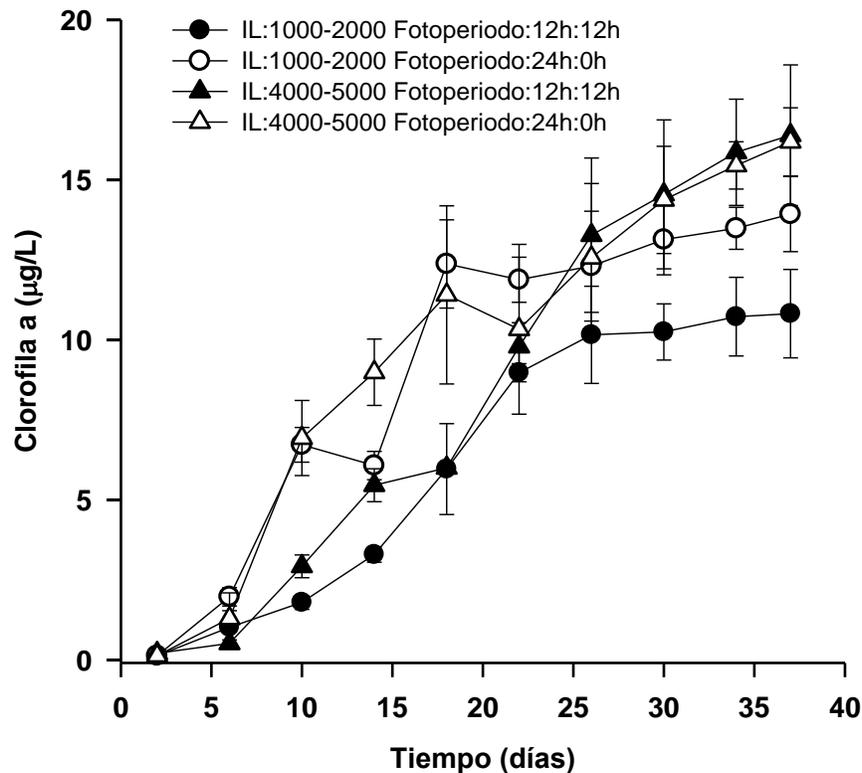


Figura 3. Comportamiento de la clorofila-a durante el ensayo sobre condiciones de luz blanca en intensidades de luz IL: 1000-2000 y 4000-5000 lux (Factor 1) y fotoperiodos 12h luz - 12h oscuridad y 24 h luz – 0 h oscuridad (Factor 2). Valores presentados como promedio \pm desviación estándar de los valores medidos de clorofila-a (mg/L).

La evaluación de la tasa de crecimiento diaria, nos permite observar los cambios en el tiempo, en cuanto al aumento o disminución celular de *Chlorella* sp., respecto a un valor inicial, es decir, nos permite observar en qué fase del experimento se da el mayor crecimiento. En la

figura 4 se observa la tasa de crecimiento diaria para los cuatro tratamientos evaluados, donde se observa que la mayor tasa de crecimiento se da entre los 5 y 13 días del ensayo, alcanzando el máximo crecimiento a los 9 días. Como es de esperarse el valor de esta tasa de crecimiento al final del ensayo (37 días) tienden a ser iguales en todos los tratamientos que coincide con la fase estacionaria del experimento. Al final del ensayo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para los factores (Factor 1 intensidad lumínica $p=0,2524$ y factor 2: fotoperiodo $p=0,7041$), ni para la interacción entre los factores ($p=0,3017$).

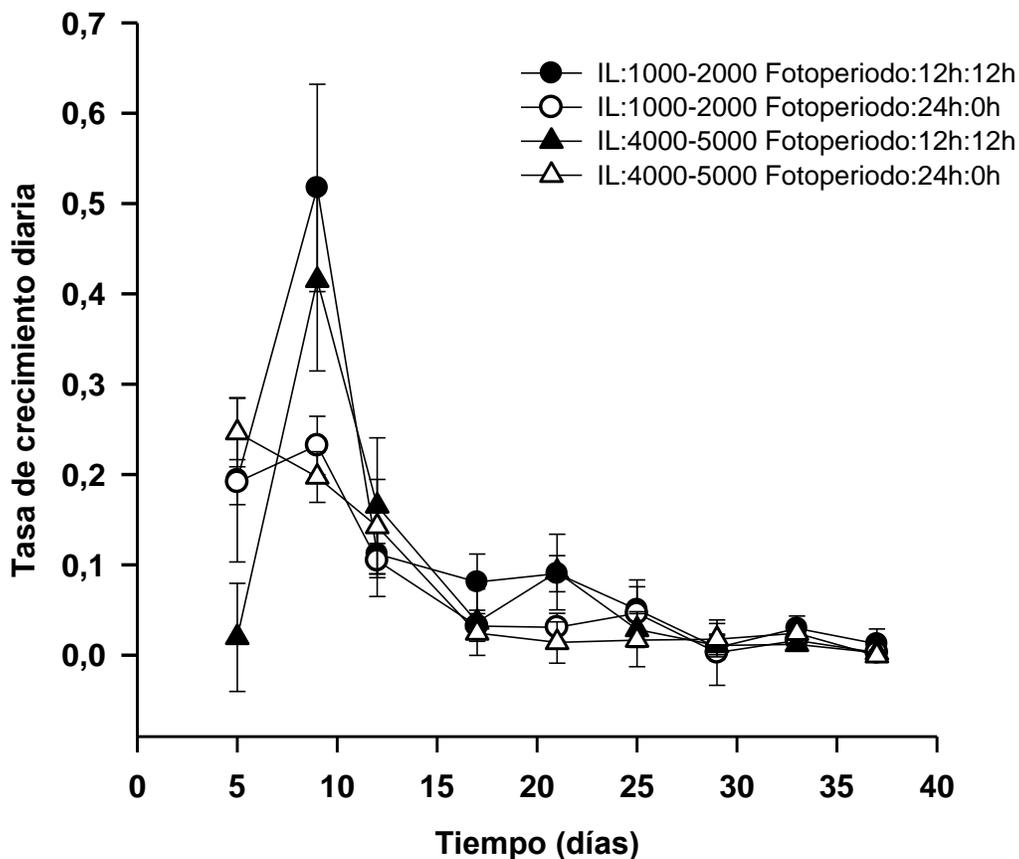


Figura 4. Comportamiento de la tasa de crecimiento diaria durante el ensayo sobre condiciones de luz blanca en intensidades de luz IL: 1000-2000 y 4000-5000 lux (Factor 1) y fotoperiodos 12h

luz - 12h oscuridad y 24 h luz – o h oscuridad (Factor 2). Valores presentados como promedio \pm desviación estándar de los valores de la Tasa de crecimiento diaria de *Chlorella* sp.

En la evaluación de los lípidos al final del ensayo (día 37), se observó que el tratamiento con intensidad lumínica 4000-5000 lux en fotoperiodo 24 horas luz, presentó el mayor valor en % de lípidos con 1,40 en promedio, seguido del tratamiento intensidad lumínica 1000-2000 lux en fotoperiodo 12 horas luz 12 horas oscuridad con un valor en promedio 0,92. No se encontraron diferencias significativas en el factor 1: intensidad lumínica ($p=0,584$) según el análisis de varianza (ANOVA); por otra parte, el factor 2: fotoperiodo si presentó diferencias significativas ($p=0,005$) (Figura 5; Tabla 3).

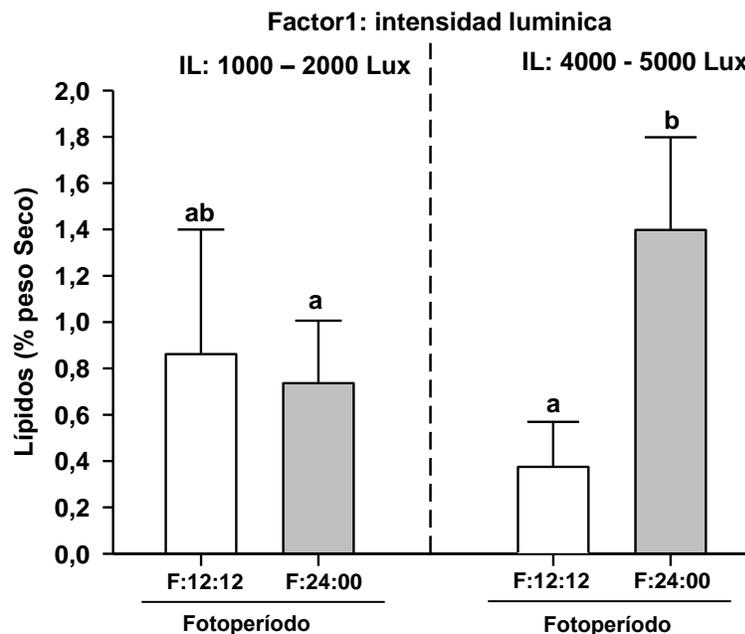


Figura 5. Promedio \pm desviación estándar del porcentaje de Lípidos (% peso Seco) en muestra seca para los dos factores evaluados (Factor 1: intensidad lumínica y Factor 2: Fotoperíodo).

Diferencias entre letras (a, b) indican diferencias significativas entre los tratamientos según el test de Tukey ($p<0,05$).

Al analizar la interacción entre los dos factores evaluados (intensidad lumínica y fotoperiodo) para la variable % de lípidos, encontramos que es significativa ($p=0,0004$), lo que indica que al aumentar la intensidad de luz y aumentar el tiempo de exposición de luz (24 horas fotoperiodo) obtenemos una mayor producción de % lípidos. En este mismo escenario al aumentar la intensidad de luz, pero en un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad disminuye significativamente la cantidad de lípidos presente en las células (Figura 6).

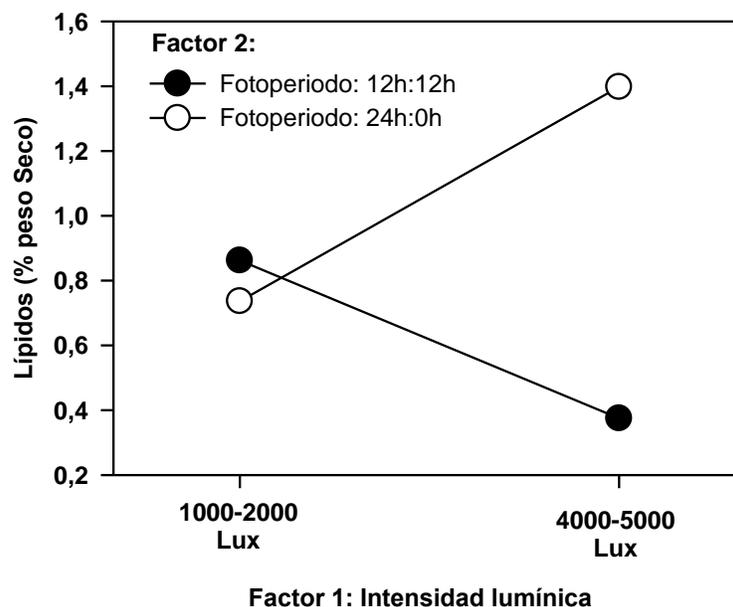


Figura 6. Interacción de los factores evaluados intensidad lumínica y el fotoperiodo en la producción de lípidos en *Clorella sp.*

Discusión

Uno de los organismos ampliamente estudiado en el mundo es la *Chlorella*, organismo unicelular, con una relación de bio-volumen óptima y con la mejor eficiencia en la taza fotosintética, atractiva por su fácil cultivo, rápido crecimiento y su alto potencial en la producción de metabolitos secundarios (Singh y Patel 2012). Sin embargo, con la intención de mejorar las condiciones de cultivo, que permitan obtener resultados más eficientes se evaluó la relación de la intensidad de luz y el fotoperiodo en la acumulación de lípidos. Teniendo en cuenta que tanto la luz como el fotoperiodo son requeridos para la fotosíntesis, estas dos variables influyen en el crecimiento y también en la fijación de carbono (Gunawan et al., 2018) que directamente influyen en la síntesis de compuestos orgánicos.

En general los resultados sugieren que hasta el día 17 (fase de crecimiento exponencial), los tratamientos que recibieron 24 horas de luz, se observaron las densidades más altas. Por otra parte, para el efecto del fotoperiodo sobre la densidad algal en la fase estacionaria (entre los 21 días y los 37 días) se encontró que los tratamientos que recibieron 12 horas luz y 12 horas oscuridad presentaron valores más altos, comparados con los tratamientos que recibieron 24 horas de luz (Figura 2), estos resultados concuerdan con los reportados por Atta (2013), donde los tratamientos que recibieron 24 horas de luz presentaron las densidades más bajas y los resultados reportados por Gunawan et al., (2018) en *Chlorella pyrenoidosa*.

En el comportamiento de la clorofila- α en la fase estacionaria, se encontró diferencias significativas en el factor de la intensidad lumínica ($p=0.0007$), es decir que los tratamientos que recibieron 4000-5000 lux presentaron los valores más altos de clorofila- α , lo cual puede ser explicado por la mayor cantidad de luz que penetra el cultivo y por tanto una mayor cantidad de

energía lumínica disponible y una reducción del efecto sombra (Gim et al., 2016). Por otra parte, se ha encontrado que la incidencia de la intensidad lumínica más alta sobre los cultivos, pueden generar una fase exponencial corta y una fase estacionaria muy larga (Atta et al., 2013) (Tabla 4).

Tabla 5.

Comparación de la densidad celular a los 9 días, 37 días y el contenido de lípidos en cepas de Chlorella Spp.

Especie	Intensidad de luz		Fotoperiodo	Densidad celular 9 días	Densidad celular 37 días	Contenido Lípidos (%)	Autor
	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Lux					
<i>C. vulgaris</i>	200	14823	12h:12h	0,9 ($\times 10^8$ Cél/ml)	NR	1,63	Atta et al., (2013)
<i>C. vulgaris</i>	200	14823	16h:08h	2,1 ($\times 10^8$ Cél/ml)	NR	1,96	Atta et al., (2013)
<i>C. vulgaris</i>	200	14823	24h:0h	0,8 ($\times 10^8$ Cél/ml)	NR	1,85	Atta et al., (2013)
<i>Chlorella sp.</i>	23 -46	1000-2000	12h:12h	0,019 ($\times 10^8$ Cél/ml)	0,085 ($\times 10^8$ Cél/ml)	0,92	Presente estudio
<i>Chlorella sp.</i>	23 -46	1000-2000	24h:0h	0,027 ($\times 10^8$ Cél/ml)	0,06 ($\times 10^8$ Cél/ml)	0,74	Presente estudio
<i>Chlorella sp.</i>	92-115	4000-5000	12h:12h	0,025 ($\times 10^8$ Cél/ml)	0,087 ($\times 10^8$ Cél/ml)	0,37	Presente estudio
<i>Chlorella sp.</i>	92-115	4000-5000	24h:0h	0,030 ($\times 10^8$ Cél/ml)	0,063 ($\times 10^8$ Cél/ml)	1,4	Presente estudio
<i>Chlorella sp.</i>	38,34	2100	12h:12h	NR	NR	0,074	Prakash Rai et al., (2015)
<i>Chlorella sp.</i>	36,43	2700	12h:12h	NR	NR	0,204	Prakash Rai et al., (2015)
<i>Chlorella sp.</i>	44,53	3300	12h:12h	NR	NR	0,094	Prakash Rai et al., (2015)

Fuente: Autora, 2021.

Un trabajo realizado en *Chlorella pyrenoidosa* donde se avaluó la intensidad de luz y el fotoperiodo sobre el crecimiento, encontraron que la interacción entre la intensidad de la luz y el fotoperiodo fue no significativa, resultados muy similares a los reportados en este trabajo con *Chlorella* sp.

En cuanto a la tasa de crecimiento (Figura 4) se observó que los valores más altos se alcanzan en el día 7, es decir en la fase exponencial, seguido de una disminución hacia la fase estacionaria. En el día 7 se observó que los tratamientos con fotoperiodo 12 horas luz y 12 horas oscuridad, presentaban los valores más altos comparados con los tratamientos que recibieron 24 horas de luz.

En forma general las microalgas necesitan tanto un régimen de luz como de oscuridad para completar el proceso fotosintético y metabólico, donde la fase oscura permite la biosíntesis de proteínas celulares, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos (Cheirsilp y Torpee, 2012).

La importancia de los lípidos en las algas radica en la capacidad de almacenar carbono y energía en condiciones de estrés, que puede conducir a una severa inhibición del crecimiento celular y una fuerte degradación de la clorofila (Zhu et al., 2014), así la respuesta celular sería acumular una mayor cantidad de lípidos en un largo plazo, y una relación directa entre el tamaño y complejidad (mayor saturación) de los ácidos grasos producidos por las microalgas con un mayor estrés metabólico.

En el presente trabajo se encontró que al aumentar la intensidad lumínica y el fotoperiodo a 24 horas de luz se obtiene la mayor cantidad de % de lípidos (1,4%), donde según el análisis de varianza de dos factores se encontró que la interacción fue significativa entre los factores evaluados (intensidad lumínica y fotoperiodo) (Figura 6), es decir que al aumentar la cantidad de

energía lumínica y la cantidad de tiempo de exposición a la luz, obtenemos una mayor producción de lípidos a nivel celular de *Chlorella* sp. Algunos autores encontraron que al aumentar la intensidad de luz gradualmente en un cultivo, se puede lograr una mayor producción de biomasa con altos contenidos de lípidos, llegando hasta dos veces la producción de un cultivo en condiciones normales de luz (Cheirsilp y Torpee, 2012), otros autores sugieren un incremento leve de los ácidos grasos al aumentar la intensidad de luz (Gim et al., 2016).

También se ha documentado que el estrés celular en cepas de *Chlorella* por diferentes agentes como el nitrógeno genera una degradación de la clorofila acompañada de la síntesis de almidón que luego es precedida en acumulación de lípidos como respuesta rápida al estrés ambiental (Zhu et al., 2014). Igualmente, algunos estudios encontraron que una mayor biomasa y contenidos de ácidos grasos, está relacionado con una reducción del contenido de proteínas en microalgas como *Scenedesmus* y *Desmodesmus* (Nzayisenga et al., 2020).

Aunque en *Chlorella*, se ha encontrado que, al aumentar la intensidad de luz, aumentamos la cantidad de energía (exceso de luz), que es convertido en una mayor cantidad de lípidos (Gim et al., 2016), donde los pigmentos absorben la luz y es convertido el ATP a NADPH, y finalmente es almacenado como energía química en forma de almidón y/o lípidos por fijación de CO₂ mediante el ciclo de Calvin y la lipogénesis. Sin embargo, Cheirsilp y Torpee (2012) encontraron que en otras especies de microalgas aumentar la intensidad de luz reduce los contenidos de lípidos.

Dentro la caracterización de la composición de ácidos grasos (lípidos) producidos por diferentes cepas de *Chlorella* se ha reportado principalmente compuestos de carbono C16:0 (31%), C18:0 (20%), C18:2 (12%) y C18:3 (6%) del total de lípidos, los cuales son apropiados

para la producción de biodiesel a partir de *Chlorella* (Petkov and Garcia, 2007) y que proyecta una alternativa viable.

En la actualidad las microalgas siguen siendo estudiadas como modelos de organismos fotosintéticos, capaces de producir moléculas orgánicas, entre ellas compuestos lípidos complejos, a los que se atribuye un potencial para generar biodiesel. Por tanto, se hace necesario estudiar el comportamiento de las microalgas en diferentes condiciones heterotróficas como la adición de una fuente de carbono y de glucosa donde se ha encontrado una producción significativa de biomasa y ácidos grasos (Singh y Patel, 2012).

7. Conclusiones

Como conclusión del trabajo podemos establecer que al aumentar la intensidad lumínica y el fotoperiodo a 24 h luz se obtiene la mayor concentración de lípidos a nivel celular en *Chlorella* sp., y dichos lípidos son compuestos de gran valor y potencial para los biocombustibles. Por otra parte, la mayor densidad de algas se obtiene en fotoperiodos 12h:12h luz: oscuridad, el cual no guarda relación con la producción de lípidos, ni con la concentración de clorofila-a, lo que permite establecer que la producción de lípidos está relacionada como una respuesta celular al estrés por luz y no a la biomasa.

La metodología aplicada muestra resultados satisfactorios en la acumulación de lípidos de las microalgas, en relación del fotoperiodo y la intensidad lumínica.

8. Referencias

- Alvarez-Delgado, Amaury; Otero-Rambla, Miguel A.; Faife-Pérez, Evelyn; (2012). Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energía renovable (Parte II: Microalgas). ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, septiembre-Diciembre, 26-35.
- Arias, M., Martínez, A., y Cañizares, R. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 43-68.
- Aries, B. (2006). ¿De qué manera el combustible fósil impacta sobre la sustentabilidad del ecosistema? Recuperado http://www.ehowenespanol.com/manera-combustible-fosil-impacta-sustentabilidad-del-ecosistema-como_52806/
- Atta, M., Idris, A., Bukhari A. y S. Wahidin. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 148 (2013) 373–378. DOI:[10.1016/j.biortech.2013.08.162](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.162)
- Balat, M., y Balat, H. (2010). Progress in biodiesel procesing. *Applied Energy* 87 (2010) 1815–1835. doi: [10.1016/j.apenergy.2010.01.012](https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.01.012)

- Balat, **My** Balat, H. (2010). Progress in biodiesel *processing*. *Applied Energy* 87 (2010) 1815–1835. doi:10.1016/j.apenergy.2010.01.012
- Barrientos Marin, J. y Vasco Correa, C. (2020). Producción de biocombustibles y empleo rural en Colombia 2009-2015. *Apuntes del Cenes*, 39 (70). 233 - 260.
<https://doi.org/10.19053/01203053.v39.n70.2020.10426>
- Blanco, M., y Alfonso, Y. (2008). Algas, aliadas en el pasado y sustento para el futuro. *Tecnología Química. Tecnología Química*, vol. XXVIII, núm. 3, pp. 46-50
- Brennan, L., y Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae. review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy* 14(2) 557-577. doi: 10.1016/j.rser.2009.10.009
- Castellanos, I. C.; González-Peralta, K.; Pinzón-Torres, S. J. (2018). Microalgas como alternativa sostenible para la producción de biodiesel. *Revista Ontare*, vol 6, (83-109).
DOI: <https://doi.org/10.21158/23823399.v6.n0.2018.2425>
- Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., y Rodríguez-Núñez, J. R. (2018). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas. *HIDROBIOLÓGICA*, 27(3), 337-352.
<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbh/hidro/2017v27n3/Rodriguez>
- Chauvet, M., González, L. (2008). Biocombustibles y cultivos biofarmacéuticos: ¿oportunidades o amenazas?. *El Cotidiano*, 23(147) 51-61. Recuperado de
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=32514707>

Chávez, N., Medina, L., Jáuregui, J. (2012). Biodiesel, un combustible renovable. *Investigación y Ciencia*, 55. 62-70. <https://doi.org/10.21158/23823399.v6.n0.2018.2425>

Cheirsilp, B., Torpee, S., 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation (in press). *Bioresource Technology* 110 (2012) 510–516. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.125

Faife, P., Otero, R, M, A y Alvarez, D, A., (2012). Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energía renovable (Parte II: Microalgas). *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 46(3),26-35.

Ferrero, I. 2011. Producción de biodiesel a partir de microalgas como alternativa a los cultivos clásicos. Monografía Universidad Nacional del Litoral. Facultad de bioquímica y ciencias biológicas. Santa Fé. Argentina.
<http://institutoideal.org/ecologicas/wpcontent/uploads/2012/08/03-Ignacio-Ferrero.pdf>

Flores, Coral Contreras, Peña-Castro, Julián Mario, Flores-Cotera, Luis Bernardo, y Cañizares-Villanueva, Rosa Olivia. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28(8) 450-456.

García, H.,Corredor, A., Calderón, L., y Gómez, M. (2013). Análisis costo beneficio de energías renovables no convencionales en Colombia; centro de investigación de económica y social; Fedesarrollo, Colombia. Recuperado
http://www.fedesarrollo.org.co/wp-content/uploads/2011/08/WWF_Analisis-costo-beneficio-energias-renovables-no-convencionales-en-Colombia.pdf

- García, H., Corredor, A., Calderón, L., y Gómez, M. (2013). Análisis costo beneficio de energías renovables no convencionales en Colombia; centro de investigación de económica y social; Fedesarrollo, Colombia. Recuperado http://www.fedesarrollo.org.co/wp-content/uploads/2011/08/WWF_Analisis-costobeneficio-energias-renovables-no-convencionales-en-Colombia.pdf
- Gim G. H., Ryu J., Kim M. J., Kim P. I. y S. W. Kim. Effects of carbon source and light intensity on the growth and total lipid production of three microalgae under different culture conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2016;43(5):605–16. DOI: [10.1007/s10295-016-1741-y](https://doi.org/10.1007/s10295-016-1741-y)
- Gunawan, T., Ikhwan y., Restuhadi F. y U. Pato. Effect of light Intensity and photoperiod on growth of *Chlorella pyrenoidosa* and CO₂ Biofixation. *E3S Web Conf.*, 31 (2018) 03003. DOI: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20183103003>
- Huang Gh, Chen F, Wei D, Zhang X, Chen G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy.* 87(1) 38-46
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.06.016>
- Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., Chen, G., Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy.* 87(1) 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.06.016>
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J. Z., Barrios, F., y Zapata, C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), .

Kargi Y A. Uygur., (2010). Effect Of The Carbon Source In The Biological Elimination Of Nutrients In A Non-Continuous Reactor. *Bioresource Technol.*, 89, Pp. 89-93. DOI: 10.1016/s0960-8524(03)00031-2

López, J. A., N. García, L. Jiménez y N. Huerta. (2009). Crecimiento de la diatomea *Thalassiosira Pseudonana* en cultivos estáticos con iluminación continua y fotoperiodo a diferentes salinidades. *Biotechnia*, vol 11 No. 1 52:113-22.

Marshall JD, Waring RH (1986) Comparison of methods of estimating leaf area index in old-growth douglar fir. *Ecology* 67, 975-979

Ministerio de Minas y Energía. (2009). Biocombustibles en Colombia. Unidad de Planeación Minero Energética. República de Colombia. Recuperado http://www.upme.gov.co/Docs/Biocombustibles_Colombia.pdf

Ministerio de Minas y Energía. (2009). Biocombustibles en Colombia. Unidad de Planeación Minero Energética. República de Colombia. Recuperado http://www.upme.gov.co/Docs/Biocombustibles_Colombia.pdf

Nzayisenga, J., Farge, X., Groll, L. y A. (2020) Sellstedt. Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. *Biotechnol Biofuels* 13:4 DOI: 10.1186/s13068-019-1646-x

Oroná, C. (2012). *Caracterización limnológica de un sistema de agua salada de una cuenca endorreica Presentada.* [Tesis de Doctorado Universidad de la Coruña] <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=38486>

- Pasquevich, D. (2010). La creciente demanda mundial de energía frente a los riesgos ambientales, Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable, Comisión Nacional de Energía Atómica. Asociación Argentina para el Desarrollo de las Ciencias. Argentina.
- Perez, R., Delgado, J., Salgado, J., (2015). Perspectivas de los biocombustibles en Colombia. Revista Ingenierías Universidad de Medellín. 14(27) Revista ingenierías universidad de Medellin DOI:[10.22395/riium.v14n27a1](https://doi.org/10.22395/riium.v14n27a1)
- Petkov, G., Garcia, G., 2007. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 281–285.
- Queiroz, L., Jacob, E., Teixeira, T., Francisco, C., y Manzoni, M. (2015). Produção de biodiesel de 3ª geração a partir de cianobactéria *phormidium* sp. empregando manipueira como substrato. 488-492. DOI:[10.5151/chemeng-cobeq2014-0336-25949-172298](https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-0336-25949-172298)
- Queiroz, L., Jacob, E., Teixeira, T., Francisco, C., y Manzoni, M. (2015). Produção de biodiesel de terceira geração a partir de microalgas. *Ciência Rural*. 45(2) Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33133798027>
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ramírez, J y Rodríguez , J., (2019). Conveniencia de la producción de biodiesel en Colombia desde la perspectiva del desarrollo sostenible. [Trabajo de Grado. Universidad Católica de Colombia]. Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas. Programa de Economía. Bogotá, Colombia.

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., y Tredici, M. R.

(2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 100–112. <https://doi.org/10.1002/bit.22033>

Salaet, S., y Roca, J. (2010). Agotamiento de los combustibles fósiles y emisiones de co2: algunos posibles escenarios futuros de emisiones. *Revista Galega de Economía*, Vol. 19, Núm. 1, pp. 1-19 Universidad de Santiago de Compostela España.

Schallenberg, J., Piernavieja, G., Hernández, C., Unamunzaga, P., Garcia, R., Diaz, M., Cabrera, D., Martel, G., Pardilla, J., y Subiela, V. (2008). Otras energías renovables. En Instituto Tecnológico de Canarias (Ed.), *Energías Renovables y Eficiencia Energética*. (pp 103-107) Instituto Tecnológicos de Canarias

Serna, F., Barrera, L., y Montiel, H. (2011). Impacto Social y Económico en el uso de Biocombustibles. *Journal of technology management y innovation*, 6(1), 100-114. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-27242011000100009>

Singh, N. and Patel, D. (2012): Microalgae for Bioremediation of Destillery Effluent. *Farming Food Water Security, Sustainable Agriculture Reviews* 10: 83-109, DOI 10.1007/978-94-007-4500-1_4.

Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., y Merzlyak, M. (2007). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology*, 20, 245-251. doi 10.1007/s10811-007-9233-0

- Subía, S., y Rubio Aguiar, R. J. (2018). Evaluation of Micro-Algae Biomass in the Limoncocha Lagoon as a Raw Material for the Production of Bio-fuels. *Enfoque UTE*, 9(2), pp. 106 - 116. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n2.199>
- Tovar, M. E., (2019, octubre) Por baja en mezcla, cierran once plantas de biodiesel. Portafolio EL TIEMPO Casa Editorial
- Valdez, R. (2009). Biocombustibles, perspectivas, riesgos y oportunidades. *Perspectivas*, 23(1) 41-53. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=425942159004>
- Valdez, R., (2009). Biocombustibles, perspectivas, riesgos y oportunidades. *Perspectivas*, 23, pp.41-53
- Vásquez, V., Vergaray, D., Méndez, J., Barrios, I., Baquedano, R., Caldas, C., Cruz, J., Gamboa, J y Rivera, I. (2017). Efecto de la intensidad de diodos electroluminosos y fotoperiodo en la optimización de la producción de biomasa de Spirulina (Arthrospira). *Scientia Agropecuaria*, 8(1), 43-55. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.01.04>
- Velasco, L. A., Barros-Gómez, J., Ospina-Salazar, G. H., y Trujillo, C. A. (2009). Efecto de la intensidad lumínica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana* (Clon T-ISO). *Intropica*, 4(1), 93–99. Recuperado a partir de <http://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/142>
- Villa, A., D. Herazo y A. C. Torregroza. (2014). Efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento de la diatomea *Chaetoceros calcitrans* (Clon C-Cal) en cultivos estáticos. *Revista Intropica* 9: 111 – 117. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2017.01.04

Yeh, K. L., y Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-

31. *Bioresource technology*, 105, 120–127.

<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.06.016>

Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., y Yuan, Z. (2014). Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella*

zofingiensis. *Bioresource technology*, 152, 292–298.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.092>