

# PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS *Scenedesmus spp.* EN FOTOBIORREACTOR TANQUE AGITADO

BIOSIESEL PRODUCTION FROM MICROALGAE *Scenedesmus spp.* ROUGH IN TANK PHOTOBIOREACTOR

JOSÉ GONZÁLEZ CABEZA<sup>1</sup>  
ALEXANDER TERÁN ROJAS<sup>2</sup>

## Resumen

A consecuencia de la utilización de combustibles de origen fósil y de las secuelas que acarrea, surgen nuevas alternativas energéticas, cuya obtención debe ser sostenible ambiental, social y económicamente. Una de ellas es la utilización de microorganismos con alto contenido oleaginoso, tal es el caso de las algas que, además de presentar un alto índice de crecimiento, son organismos fotosintéticos capaces de capturar y almacenar CO<sub>2</sub> atmosférico y, por tanto, disminuir el efecto invernadero causado por este gas en el ambiente. En tal sentido, es de interés particular el alga de agua dulce *Scenedesmus spp.* que se cultivó en soluciones con diferente concentración de Nitrofoska Verde®, resultando óptima la trabajada al 0,01%. La biomasa húmeda y seca fue del orden de 3.81252 gr/Lt y 0.165 gr/Lt respectivamente, esta última se constituyó como materia prima para obtener aceite siguiendo la metodología de Soxhlet, lográndose un rendimiento de 6.323%. Como consecuencia de lo anterior, se procedió a las reacciones de transesterificación con metanol como sustancia reactiva e hidróxido de sodio como catalizador, a una temperatura de 60°C, tiempo de reacción de 90 minutos y agitación constante de 200 rpm. El rendimiento de biodiesel a partir del aceite de *Scenedesmus spp.* fue de 85,034%.

## Palabras clave

Biodiesel | microalga | aceite | transesterificación

## Abstract

Result of the injuries that entails the use of fossil fuels, is that new energy alternatives, the preparation must be environmentally, socially and economically sustainable arise. One of them is the use of microorganisms with high oil content such as algae, also by a high growth rate, photosynthetic organisms be able to capture and store atmospheric CO<sub>2</sub>, and therefore reduce the greenhouse effect caused by this gas in the atmosphere. In this regard, of particular interest is the seaweed fresh water *Scenedesmus spp.* which was grown in solutions with different concentration of Nitrofoska Green®, the resulting optimal Worked 0.01%. The wet and dry biomass was approximately 3.81252 gr/Lt and 0.165 gr/Lt respectively, the latter was formed as a raw material for oil following the methodology of Soxhlet, achieving a yield of 6.323 %. Consequence of this is proceeded to transesterification reactions as reactive substance with methanol and sodium hydroxide as a catalyst at a temperature of 60°C, reaction time 90 minutes with constant stirring at 200 rpm. The yield of biodiesel from oil *Scenedesmus spp.* was 85.034 %.

## Keywords

Biodiesel | microalgae | oil | transesterification

<sup>1</sup> Biólogo. Doctor en Biotecnología. Profesor del Departamento de Ciencias de la UPAO

<sup>2</sup> Técnico en Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la UPAO.

## I. Introducción

Hoy en día toma relevancia el reemplazo de combustibles fósiles por otras alternativas renovables, condicionando de esa manera la disminución de la dependencia respecto al petróleo, además de ser un instrumento de lucha contra el deterioro medioambiental y promover el desarrollo de la agricultura e industrias derivadas (Stratta, 2000).

Actualmente, el 80% del petróleo que se consume en el mundo proviene de pozos descubiertos en la década de 1970; es así que el consumo de petróleo pasó de 2,753 millones de barriles en 1973, a 3,767 millones en el 2004 (Carrere, 2006). Diariamente la extracción de petróleo es de 75 millones de barriles, y se espera una demanda creciente de 2% anual para los próximos años; según las proyecciones para el 2020 se deberá necesitar unos 100 millones bboe/día.

De otro lado, el calentamiento global y muchos problemas ambientales son debidos en gran medida al uso indiscriminado de combustibles fósiles. A consecuencia de ello, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) aprobó en 1992 la Convención Marco sobre el Cambio Climático, cuyo objetivo declarado fue que los gases causantes del efecto invernadero debían estabilizarse en valores que no supongan un riesgo. En 1997, el Protocolo de Kyoto fijó obligaciones de reducción de dichos gases que afectan básicamente a los países industrializados (Carrere, 2006). Producto de ello, una de las soluciones planteadas es la sustitución de los combustibles fósiles por biocombustibles obtenidos de cultivos energéticos; sin embargo, el tema de los biocombustibles es polémico y sus ventajas y desventajas se siguen discutiendo. No obstante se sostiene que, a menos que se cambie el modelo de desarrollo y se inicie una transición hacia una sociedad postpetrolera, con nuevos patrones de consumo de energía, los biocombustibles no serán una solución para frenar el cambio climático (Carrere, 2006).

Los biocombustibles están constituidos por alcoholes, éteres, ésteres y otros compuestos químicos provenientes de una fuente que no es de origen mineral o fósil, sino biológica, conocida como biomasa (Sánchez Macías, 2006), y son obtenidos por molturación de productos de origen agrícola y destilación de líquidos (Clarimón et al., 2007). Estos al combinarse con el oxígeno generan la combustión y liberan energía (Fernández, 2006).

Tanto en Europa como en los Estados Unidos de América, el biodiesel está siendo producido y utilizado en cantidades comerciales. En 1998, la DOE (U.S. Department of Energy) designó al biodiesel puro como un combustible alternativo y estableció un programa de créditos para el uso de biodiesel; sin embargo las mezclas no han sido designadas como un combustible alternativo. EE.UU. utiliza una mezcla que contiene

10% de etanol, este producto le otorga un valor agregado al maíz y además genera co-productos en el proceso, como por ejemplo CO<sub>2</sub> para el uso de bebidas carbonatadas, y granos destilados con alta concentración de proteínas para alimentación ganadera (Clarimón et al., 2007). En el viejo continente, el biodiesel es producido principalmente a partir del aceite de la semilla de canola (también conocida como colza) y el metanol, denominado comercialmente como RME (Metil Ester de canola), el cual es utilizado puro o mezclado con aceite diesel en las máquinas diesel, en proporciones que van desde un 5% hasta un 20% generalmente. En Alemania y Austria se usa puro para máximo beneficio ambiental (Clarimón et al., 2007).

En Alemania, el biodiesel está disponible en cerca de 1,000 estaciones de llenado de combustible de las 16,000 estaciones, su participación está en el orden de 0.3 % del diesel vendido, lo cual equivale a 100,000 toneladas. Se espera que esto se eleve a quizás 300,000 toneladas en el futuro cercano. La primera biorefinería alemana se construirá en Emden con financiación de una asociación holandesa; el objetivo de la fábrica es convertir 430,000 toneladas de aceite de palma, probablemente de origen indonesio, en más de 400 millones l/año de biodiesel (Carrere, 2006). España es uno de los países de la Unión Europea con más consumo de aceite vegetal por habitante. El bioetanol posee salida como materia prima para la fabricación de ETBE (Etil ter-butil éter), un aditivo oxigenado de elevado índice de octano, aunque se usa de formahabitual en mezclas con gasolinas (Clarimón et al., 2007). La directiva europea sobre biocombustibles deberá constituir el 5.75% del combustible utilizado para el transporte en Europa; esta cifra podría aumentar al 20% para 2020 (Carrere, 2006).

En América Latina, Venezuela, pese a poseer importantes reservas de petróleo, se dispone a integrarse con Brasil y Argentina en el desarrollo de combustibles de origen vegetal como alternativa energética. La búsqueda de tecnologías para producir combustibles alternativos, entre ellos el biodiesel, se incluye también en un acuerdo recientemente firmado por Venezuela y otros 13 países caribeños para la creación de Petrocaribe. La empresa española



Repsol, que ya produce biodiesel en España, invertirá 30 millones de dólares en una primera planta de biodiesel en Argentina, que comenzó a construirse en el 2007. La capacidad instalada será de 120,000 m<sup>3</sup>/año (Carrere, 2006). En Brasil, el mercado doméstico de biodiesel se estima en cerca de 840 millones l/año, según el Ministerio de Energía, y el gobierno tiene por objetivo el introducir un 5% de mezcla biodiesel, se proyecta que se estará invirtiendo 1,900 millones de dólares en plantas de biodiesel en los próximos cuatro años. La mayor parte de los combustibles que poseen alcohol en estado puro o en mezclas en Brasil son producidos por refinerías de Petrobras, la empresa estatal.

Las ventajas que ofrecen los biocombustibles son múltiples; así por ejemplo, presentan un gran potencial como fuente de abastecimiento para el sector del transporte, mejorando la posibilidad de autoabastecimiento energético en un marco regional (Clarimón *et al.*, 2007); son de bajo contenido de azufre, cloro, partículas de gases de escape, producen menores emisiones de monóxido de carbono (CO), hidrocarburos (HC) y óxido de nitrógeno, respecto a los combustibles fósiles. Su emisión de dióxido de carbono es considerada como neutra, ya que las plantas, en su etapa de crecimiento, consumen la misma cantidad de CO<sub>2</sub> que la emitida por el biocombustible (Clarimón *et al.*, 2007). Por otro lado, reduce la dependencia de los combustibles minerales que, además de ser un producto de fuentes no renovables, tienen un precio muy variable en el mercado (SAGPYA, 2006), la utilización de productos agrarios, muchas veces desperdiciados, en los procesos de fabricación puede impulsar la actividad agrícola en muchos países, diversificando su economía. Aquellos países que no tienen ventaja competitiva en la producción de alimentos podrían impulsar los cultivos energéticos (SAGPYA, 2006). No requiere de generación de grandes infraestructuras, ya que emplea materia prima, maquinaria y logística existentes en la actualidad (Sánchez Macías, 2006); subsecuentemente, genera empleos no sólo por el proceso de elaboración propiamente dicho, sino también por la generación de la materia prima para elaborar los mismos (SAGPYA, 2006).

Las desventajas de los biocombustibles han sido un tema controversial dentro de una sociedad que no ha aceptado que vivirá una era postpetróleo y no se ha planteado la creciente necesidad de disminuir el consumo energético. Las desventajas pueden ser las que se mencionan a continuación:

- i. El aumento del uso de fertilizantes nitrogenados, especialmente en los casos en que se trabaje con árboles de rápido crecimiento, liberará más óxido nítrico en la atmósfera, el cual tiene un efecto que es 310 veces más poderoso que el del dióxido de carbono en lo que respecta al calentamiento global (Carrere, 2006).
- ii. Para cultivar las especies energéticas, es necesario limpiar tierras quemando la vegetación existente; esto podría promover que el balance neto de carbono en las áreas destinadas a la producción de biocombustibles sea negativo, aumentando así la concentración de gases de efecto invernadero en la atmósfera, que es precisamente lo que se pretende evitar con este cambio (Carrere, 2006).

- iii. El uso de tecnologías destinadas a convertir la madera en etanol está impulsando la expansión de monocultivos de árboles de crecimiento rápido en áreas boscosas y sabanas, aumentando así la deforestación; por ej.: el cultivo de soja ha sido la causa principal de deforestación en la amazonia brasilera y la selva paraguaya; mientras que el cultivo de palma lo está siendo en Indonesia y Malasia (Carrere, 2006); debido a ello la Unión Europea no está aceptando proyectos de cultivos energéticos en esas áreas. Lejos de ser esto una solución, evita el desarrollo de proyectos que pueden ser útiles. Por esto es necesario impulsar campañas de concientización, reglamentación y apoyo gubernamental.

Los aceites vegetales son la principal materia prima para la producción de biodiesel, razón por la cual el uso de cultivos de alto contenido oleaginoso ha sido estudiado exhaustivamente. Los principales materiales oleaginosos utilizados derivan de la palma, colza y soja, además del girasol, coco, cacahuate, oliva, mostaza, entre otros. (Hanna y Frangui, 1999). El mercado creciente de producción de biodiesel a partir de aceites vegetales comestibles, requeriría del uso de enormes extensiones de terreno fértil, situación que podría conllevar a crisis alimentarias ante la escasez de suelos cultivables. En el caso particular del sureste asiático y Brasil, el considerable incremento en su tasa de producción de biodiesel a partir de palma y soja, ha ocasionado problemas ambientales inherentes a la deforestación de regiones tropicales. (Dismukes, *et. al.* 2008).

En consecuencia se ha planteado el uso de aceites no comestibles procedentes de cultivos marginales tales como *Jatropha curcas* (piñón), *Calophyllum* (tamanu), *Pongamia pinnata* (Karanja), *Madhuca indica*, *Swidawil soniana*, *Ricinus communis* (higuerilla) y *Vernicia fordii* (tung). Estos cultivos marginales no requieren de terrenos fértiles, ya que proliferan en suelos áridos, pobres en nutrientes, con altos niveles de radiación y baja precipitación pluvial. (Fairless, *et. al.*, 2007). El elevado costo de la materia prima, que contribuye del 50 al 90% del precio de producción del biodiesel, ha obstaculizado la comercialización del biocombustible, motivo por el que se ha propuesto el uso de aceites de desecho y de grasas animales, alternativa que no ha sido satisfactoria a causa de los gastos adicionales necesarios para el refinamiento y la transesterificación del materia. (Al-Zuhair, 2007).

No obstante, hoy en día existen nuevas alternativas. Varias compañías están actualmente produciendo biocarburantes a partir de algas, como lo son GreenFuel Technologies o Algae biofuels en EEUU, BFS en España, Bioking Algae en Holanda y Aquafloren en Nueva Zelanda; sin embargo, la producción de estas plantas es muy pequeña y no son de mucha ayuda en la cobertura de déficit de producción de biodiesel que existe y que se prevé seguirá existiendo en los años venideros. La demanda mundial de biodiesel en este año será de más de 12 millones de toneladas, mientras que la producción de biodiesel se estima que será de aproximadamente 8 millones de toneladas, una diferencia bastante amplia que necesita pronta cobertura. (Estrada, Noguera y López., 2010).

En el Perú se implementó la Ley N° 28054, Ley de Promoción del Mercado de Biocombustibles, donde se establece el marco general para promover el desarrollo del mercado de los biocombustibles sobre la base de la libre competencia y el libre acceso a la actividad económica, con el objetivo de diversificar el mercado de combustibles, fomentar el desarrollo agropecuario y agroindustrial, generar empleo, disminuir la contaminación ambiental y ofrecer un mercado alternativo en la lucha contra las drogas. (MINEM., 2005).

De ahí la necesidad de investigar y colaborar con la producción de biodiesel a partir de microalga *Scenedesmus ssp.* en biorreactor tanque agitado, para idear planes estratégicos de biodiesel en el Perú y, por ende, desarrollar conforme a ley nuevas tecnologías para el desarrollo de energías renovables en nuestro país ante la futura escasez de los hidrocarburos a nivel mundial.

## II. Material y métodos

### Población y muestra

Las cepas de *Scenedesmus acuminatum* IMP-LBA-008 se adquirieron de la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y estuvieron representadas por 100 ml de cultivo puro de suspensión algal.

### Medio de cultivo

Para promover el crecimiento de *Scenedesmus spp.*, se emplearon soluciones al 0,1%, 0,05% y 0,01% de Nitrofoska Verde®, el cual es un abono foliar y que sirvió para satisfacer los requerimientos mínimos necesarios en el crecimiento de la microalga. Las características físico-químicas del producto aparecen descritas en el cuadro 1 y según especificaciones del distribuidor debe tenerse en cuenta que se trata de un producto higroscópico, no miscible en productos fuertemente alcalinos y con aceites minerales. Se recomienda que deba de ser siempre almacenado en su recipiente original y los envases abiertos deberán ser cerrados inmediatamente después de extraer la cantidad requerida. Tiene un periodo de caducidad de hasta tres años.

**Cuadro 1**

Características químico-físicas de Nitrofoska Verde® en la preparación de los medios de Cultivos para *Scenedesmus spp.*

Características químicas	
<b>Nutrientes principales:</b>	
Nitrógeno total (N)	25,0 %
Nitrógeno nítrico (NO <sub>3</sub> -N)	4,9 %
Nitrógeno amónico (NH <sub>4</sub> -N)	2,9 %
Nitrógeno ureico (NH <sub>2</sub> -N)	17,2 %
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	10,0 %
Potasio (K <sub>2</sub> O)	17,5 %
<b>Nutrientes secundarios:</b>	
Magnesio (MgO)	1,8 %
Azufre (S)	13,00 %
<b>Micronutrientes:</b>	
Manganeso* (Mn)	320 ppm
Hierro* (Fe)	500 ppm
Cobre* (Cu)	160 ppm
Boro (B)	150 ppm
Cinc* (Zn)	100 ppm
Molibdeno (Mn)	10 ppm
* Completamente quelatizado con EDTA.	
Características físicas:	
Aspecto:	Sal cristalina fino.
Color:	Verde claro.
Densidad aparente:	Aprox. 760 kg/m <sup>3</sup> .
Diámetro de partículas:	0,1 - 1,4 mm (80 - 90 %).

### Biorreactores

El crecimiento de microalgas se efectuó en biorreactores tanques agitados y sujetos a tres niveles de escalamiento. En primer nivel se trabajó con el propósito de establecer la debida comprobación fenotípica del cultivo puro de *Scenedesmus spp.*; para ello, las muestras fueron cultivadas en matraces de 1Lt de capacidad a temperatura ambiente (18-22°C), con un fotoperiodo día:noche de 12 horas de luminosidad (intensidad lumínica de 12 μmol/m<sup>2</sup>s) y 12 horas de oscuridad, y en agitación constante a razón de 300 ml/min. de aire es estéril.

Estas mismas condiciones fueron conservadas para el segundo nivel de escalamiento, construyéndose biorreactores de 4 Lt de capacidad. El inoculo fue de 50 ml de suspensión algal a partir de los matraces anteriores. El crecimiento en estos sistemas se realizó con el propósito de evaluar la cinética de crecimiento de *Scenedesmus spp.* bajo condiciones de laboratorio.

Finalmente, le tercer nivel de escalamiento tuvo como objetivo la obtención de biomasa, empleándose para ello recipientes plásticos de 20 Lt de capacidad y manteniendo las mismas condiciones de cultivo. El inoculo para cada uno de ellos fue de 1 Lt de suspensión de algas del segundo nivel. Asimismo se realizaron cada tres días monitoreos microscópicos de los cultivos de microalgas, para comprobar la no contaminación de diferentes microorganismos que pudieran afectar el crecimiento de *Scenedesmus spp.*

### Estimaciones de biomasa

Esta se llevó a cabo siguiendo varias metodologías: A) Método a través de la cámara de Neubauer, B) Por peso húmedo y C) Por peso seco.

### Colección de biomasa

La recuperación de biomasa se realizó siguiendo dos metodologías: 1. Por centrifugación a 5000 rpm por 10



min a partir de los biorreactores de 4 Lt, para las estimaciones cinéticas de biomasa. 2. Por sedimentación (gravedad) a partir de los recipientes de 20 Lt para las evaluaciones de rendimiento de biodiesel.

Consecuencia de ambas metodologías fue la obtención de una pasta húmeda de algas, que más adelante fue secada en estufa a 80°C por 48-72 hrs.

Las muestras completamente deshidratadas fueron pulverizadas exhaustivamente en mortero.

#### Extracción de aceites de *Scenedesmus spp*

De las diversas metodologías existentes para la extracción de aceites a partir de algas, se optó por el Método de Soxhlet, utilizando hexano como solvente. La materia prima fue el extracto deshidratado de los cultivos de *Scenedesmus spp.*

#### Obtención de biodiesel

En primer lugar se preparó una mezcla del catalizador constituido por hidróxido de potasio (KOH) y metanol, y en agitación constante por 20 min hasta la completa disolución del KOH. Esta solución se conservó tapada para impedir que reaccionara con el dióxido de carbono y la humedad del medio.

Posteriormente se realizó la adición de la mezcla con el aceite, a una temperatura de 60°C y una agitación constante a 200 rpm con tiempos de reacción de 90 min. Trascurrido los tiempos de reacción, se llevaron los productos a un embudo de decantación, donde transcurridas 24 h deben de formarse dos fases, una capa superior conteniendo el biodiesel (metilesteres) y una inferior de glicerina. La capa superior debe ser retirada y llevada a un segundo embudo de decantación en donde se le adicionó agua para retirar residuos de metanol, catalizador y glicerina.

#### Determinación del rendimiento (Rb)

Se realizó mediante la siguiente igualdad, donde los gramos de biodiesel puro son los gramos de biodiesel obtenidos al final del proceso (reacción, separación, lavado y secado) y los gramos de aceite de microalgas son los gramos de aceite adicionados al reactor al inicio de la reacción.

$$Rb = (g \text{ biodiesel puro} / g \text{ aceite microalga}) \times 100\%$$

#### Técnicas y recolección de datos.

Para determinar la varianza de la biomasa de las microalgas (*Scenedesmus spp.*), se recolectarán los datos en conteos por cámara de Neubauer donde se determinará el número de microalgas por mL de cultivo, que incluye recuentos diarios al cultivo (*Scenedesmus spp.*). También se va a medir el pH del cultivo para posteriormente tener los análisis respectivos. Se incluye además una columna de observaciones para anotaciones que pudieran ser útiles.

#### Métodos de análisis de datos para el biodiesel de *Scenedesmus spp.*

Los resultados se analizarán de varianza simple, con una significación del 95%, donde puede observarse la estrecha relación que existe entre el medio de cultivo a utilizar (Algal) y la cantidad de biomasa en g/L,

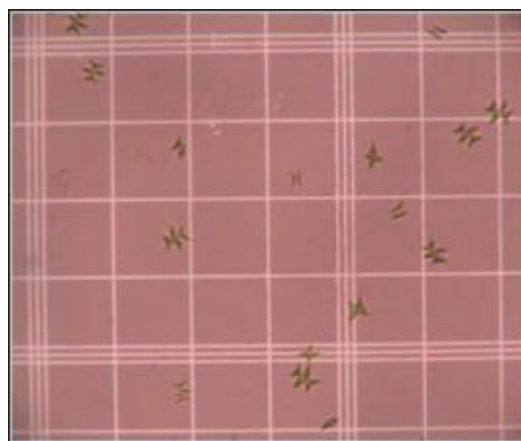
posteriormente se hallará el rendimiento en la producción del biodiesel a partir de *Scenedesmus spp.* en biorreactor tanque agitado. También se obtendrá las cantidades de aceites obtenidos a partir de las microalgas, donde se proyectará producciones a altas escalas y de acuerdo con los resultados se determinara la eficiencia del medio de cultivo algal.

### III. Resultados y discusión

*Scenedesmus spp.* es un microorganismo fotolitotrófo; ello quiere decir que obtiene su energía de la luz y su fuente carbonada a partir de compuestos inorgánicos como el CO<sub>2</sub> (Lee 1999, Csogor et al. 2001). Es uno de los géneros de algas de agua dulce más comunes en nuestro medio; sin embargo, por existir una gran diversidad de morfologías entre ellas, se complica muchas veces su identificación. Taxonómicamente la clasificamos como sigue:

Dominio:	<b>Eukaryota</b>
Reino:	<b>Plantae</b>
Phylum:	<b>Chlorophyta</b>
Clase:	<b>Chlorophyceae</b>
Orden:	<b>Sphaeropleales</b>
Familia:	<b>Scenedesmaceae</b>
Género:	<b>Scenedesmus</b>

Durante la comprobación fenotípica, obtenido a partir del primer nivel de escalamiento (cultivo inicial), se pudo advertir rápidamente que usualmente la hallamos de forma individual, aunque alternativamente también formando cenobios de dos, tres o cuatro células, tal como aparecen en la figura 2.



**Figura 1.** Observación microscópica de *Scenedesmus spp.*, consecuencia de la evaluación fenotípica. Se puede apreciar células individualizadas y/o alternativamente formando cenobios de 2 – 4 células.

## CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Scenedesmus* spp. en Nitrofoska Verde®

Para el crecimiento de *Scenedesmus* spp., el alga fue sometida a tres concentraciones diferentes de Nitrofoska Verde®; todo ello bajo condiciones de laboratorio y empleando biorreactores de 4 Lt de capacidad, los cuales aparecen en detalle en la figura 2. El propósito de todo fue optimizar la concentración más adecuada para la proliferación celular. Aunque si bien es cierto, existen medios de cultivo universalmente más utilizados, como lo es el F/2 de Guillard's, que ha demostrado ser eficiente para el crecimiento de un gran número de microalgas, pero demanda la utilización de una gran cantidad de nutrientes.

Resultó evidente desde un inicio que existe diferencias en la proliferación celular, tal como se muestra en la figura 2D; donde ya se percibe una mayor capacidad fotosintética por parte del alga a concentraciones menores de Nitrofoska Verde® (0,01 %). Asimismo, el análisis cuantitativo de la cinética de crecimiento a lo largo de 26 días los tenemos expuestos en los cuadros 2, 3 y 4 respectivamente; que sirvieron a su vez para la construcción de las gráficas respectivas que aparecen en las figura 3.

Consecuencia de lo anterior, podemos apreciar que en cada gráfica de la figura 2 también aparecen descritas las líneas de tendencia de crecimiento (pendiente), así como su ecuación correspondiente; de ello se deduce que la concentración en la cual obtenemos una mayor biomasa por unidad de tiempo es la menor; que corresponde a una solución de Nitrofoska Verde® al 0,01% (figura 2A). La mayor pendiente obtenida en este tipo de resultado es un excelente método para inferir qué tan pronto las poblaciones celulares alcanzan la fase estacionaria, momento de máximo crecimiento.

Asimismo, bajo concentraciones mayores podemos advertir sin embargo que la fase lag de crecimiento es más pronunciada (figura 2B y 2C), lo que nos indica que quizás a estas concentraciones no condicionan una fácil adaptación celular para dar inicio a la proliferación.



**Figura 2.** Crecimiento de *Scenedesmus* spp. en biorreactor tanque agitado, bajo condiciones de laboratorio. A) Detalle del sistema de aireación acondicionado a biorreactor de 4 Lt de capacidad. B) Piedra difusora asperjando aire estéril dentro del bioreactor. C) Biorreactor completamente ensamblado para las lecturas de crecimiento. D) Crecimiento de *Scenedesmus* spp en matraces de 1 Lt bajo diferentes concentraciones de Nitrofoska Verde®, los cuales fueron sembrados de forma paralela. E) Cultivo en recipientes de 4 Lt de capacidad.

**Cuadro 2**  
Lecturas del recuento de *Scenedesmus* spp. a través de la cámara de Neubauer, cultivado en Nitrofoska Verde® al 0.01 %.

TIEMPO (días)	Cámara de Neubauer				Promedio	Desv. Estand.	POBLACION (Células/ml)	log10 ufc/x
	n1	n2	n3	n4				
0	1	5	0	4	2.5	2.38	25000	4.40
1	2	4	0	5	2.75	2.22	27500	4.44
2	8	1	4	4	4.25	2.87	42500	4.63
3	2	5	6	4	4.25	1.71	42500	4.63
4	4	1	5	9	4.75	3.30	47500	4.68
5	1	3	4	8	4	2.94	40000	4.60
6	3	10	8	4	6.25	3.30	62500	4.80
7	16	5	2	8	7.75	6.02	77500	4.89
8	10	12	5	8	8.75	2.99	87500	4.94
9	12	10	6	13	10.25	3.10	102500	5.01
10	16	22	12	11	15.25	4.99	152500	5.18
11	16	12	20	17	16.25	3.30	162500	5.21
12	24	22	15	16	19.25	4.43	192500	5.28
13	19	28	27	24	24.5	4.04	245000	5.39
14	24	32	35	26	29.25	5.12	292500	5.47
15	33	28	41	30	33	5.72	330000	5.52
16	32	40	33	41	36.5	4.65	365000	5.56
17	49	32	42	41	41	6.98	410000	5.61
18	62	55	41	33	47.75	13.15	477500	5.68
19	68	28	39	58	48.25	18.08	482500	5.68
20	61	31	37	51	45	13.56	450000	5.65
21	65	50	25	63	50.75	18.41	507500	5.71
22	68	42	29	61	50	17.80	500000	5.70
23	43	66	38	60	51.75	13.38	517500	5.71
24	52	22	75	63	53	22.70	530000	5.72
25	34	69	66	34	50.75	19.38	507500	5.71
26	66	42	57	41	51.5	12.12	515000	5.71

**Cuadro 3**

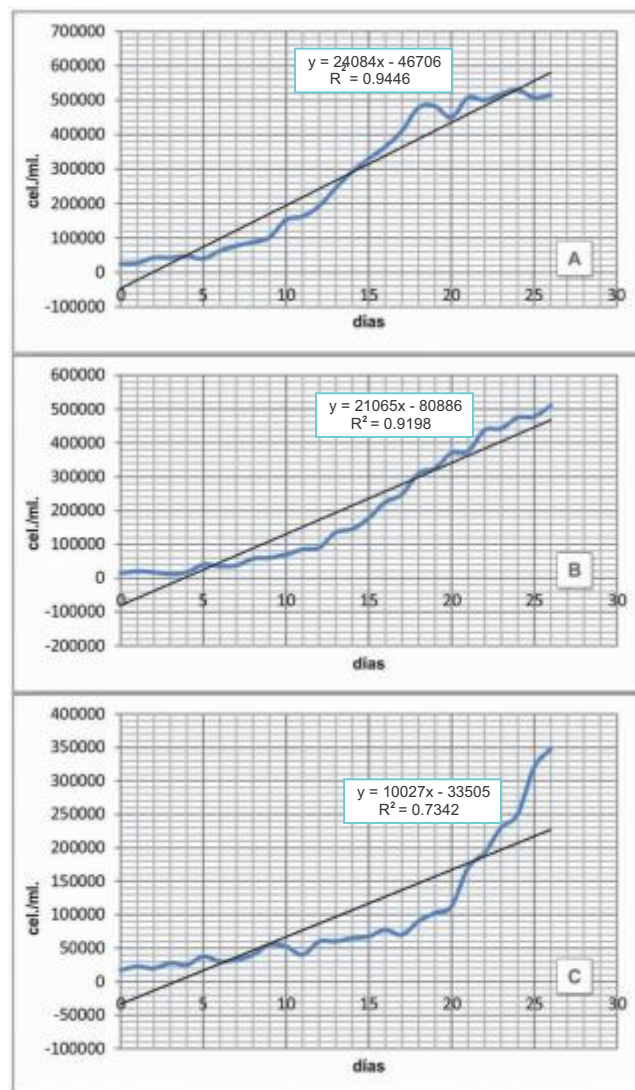
Lecturas del recuento de *Scenedesmus spp.* a través de la cámara de Neubauer, cultivado en Nitrofoska Verde® al 0.05 %.

TIEMPO (días)	Cámara de Neubauer				Promedio	Desv. Estand.	POBLACION (Células/ml)	log10 ufc/g
	n1	n2	n3	n4				
0	0	0	4	2	1.5	1.91	15000	4.18
1	0	3	0	5	2	2.45	20000	4.30
2	3	0	0	4	1.75	2.06	17500	4.24
3	1	1	3	0	1.25	1.26	12500	4.10
4	3	0	2	2	1.75	1.26	17500	4.24
5	4	2	4	6	4	1.63	40000	4.60
6	0	7	5	2	3.5	3.11	35000	4.54
7	7	2	5	1	3.75	2.75	37500	4.57
8	7	2	6	8	5.75	2.63	57500	4.76
9	6	4	3	11	6	3.56	60000	4.78
10	8	1	10	9	7	4.08	70000	4.85
11	6	12	4	12	8.5	4.12	85000	4.93
12	2	13	15	6	9	6.06	90000	4.95
13	8	18	9	19	13.5	5.80	135000	5.13
14	5	12	25	16	14.5	8.35	145000	5.16
15	13	16	14	28	17.75	6.95	177500	5.25
16	22	17	23	28	22.5	4.51	225000	5.35
17	19	22	26	32	24.75	5.62	247500	5.39
18	24	32	35	33	31	4.83	310000	5.49
19	29	25	32	44	32.5	8.19	325000	5.51
20	39	31	37	41	37	4.32	370000	5.57
21	38	42	32	38	37.5	4.12	375000	5.57
22	49	37	40	49	43.75	6.18	437500	5.64
23	43	56	38	40	44.25	8.10	442500	5.65
24	46	33	52	59	47.5	11.03	475000	5.68
25	36	57	63	35	47.75	14.36	477500	5.68
26	62	44	52	46	51	8.08	510000	5.71

**Cuadro 4**

Lecturas del recuento de *Scenedesmus spp.* a través de la cámara de Neubauer, cultivado en Nitrofoska Verde® al 0.1 %.

TIEMPO (días)	Cámara de Neubauer				Promedio	Desv. Estand.	POBLACION (Células/ml)	log10 ufc/g
	n1	n2	n3	n4				
0	1	2	0	4	1.75	1.71	17500	4.24
1	3	1	1	4	2.25	1.50	22500	4.35
2	1	5	2	0	2	2.16	20000	4.30
3	1	6	0	4	2.75	2.75	27500	4.44
4	0	2	5	3	2.5	2.08	25000	4.40
5	4	3	1	7	3.75	2.50	37500	4.57
6	0	0	8	4	3	3.83	30000	4.48
7	1	1	3	8	3.25	3.30	32500	4.51
8	0	8	1	7	4	4.08	40000	4.60
9	7	1	3	11	5.5	4.43	55000	4.74
10	0	4	12	5	5.25	4.99	52500	4.72
11	4	2	0	10	4	4.32	40000	4.60
12	0	16	0	8	6	7.66	60000	4.78
13	9	3	0	12	6	5.48	60000	4.78
14	2	4	12	8	6.5	4.43	65000	4.81
15	5	4	14	4	6.75	4.86	67500	4.83
16	6	0	13	12	7.75	6.02	77500	4.89
17	9	2	1	16	7	6.98	70000	4.85
18	2	5	18	11	9	7.07	90000	4.95
19	16	5	3	17	10.25	7.27	102500	5.01
20	19	3	7	16	11.25	7.50	112500	5.05
21	17	16	14	21	17	2.94	170000	5.23
22	21	8	16	32	19.25	10.05	192500	5.28
23	39	16	24	13	23	11.63	230000	5.36
24	18	8	39	35	25	14.54	250000	5.40
25	23	37	51	17	32	15.19	320000	5.51
26	31	40	27	41	34.75	6.85	347500	5.54



**Figura 2.** Cinética de crecimiento de *Scenedesmus spp.* bajo diferentes concentraciones de Nitrofoska Verde®. A) Nitrofoska Verde® al 0,01%. B) Nitrofoska Verde® al 0,05 %. C) Nitrofoska Verde® al 0.1%.



### ESTIMACIÓN DEL RENDIMIENTO DE BIOMASA DE *Scenedesmus* spp.

La máxima obtención de biomasa de *Scenedesmus* spp. fue estimada en el día 30, momento en el cual se ha alcanzado la fase estacionaria de crecimiento. Para ello se siguieron metodologías ya conocidas como es la estimación por peso húmedo, peso seco y cámara de Neubauer. Los cultivos fueron trabajados en recipientes de 20 Lt de capacidad y con soluciones de Nitrofoska Verde® al 0,01% tal como aparece en la figura 3, 4 y 5.

Los resultados fueron producto de 16 lecturas, las cuales aparecen en el cuadro 5; donde la biomasa húmeda promedio fue de 0.0038125 g/ml (3,81 g/Lt); mientras que la biomasa seca, que fue consecuencia de una previa deshidratación a 80°C, fue de 0.000165 g/ml (0.165 g/Lt); por tanto, el contenido de humedad de la pasta húmeda fue de un 95.97% aproximadamente. El recuento por medio de la cámara de Neubauer para este periodo de tiempo fue de  $6.75 \times 10^6$  cel/ml.



Figura 3. Cultivo de *Scenedesmus* spp. en recipientes de 20 Lt

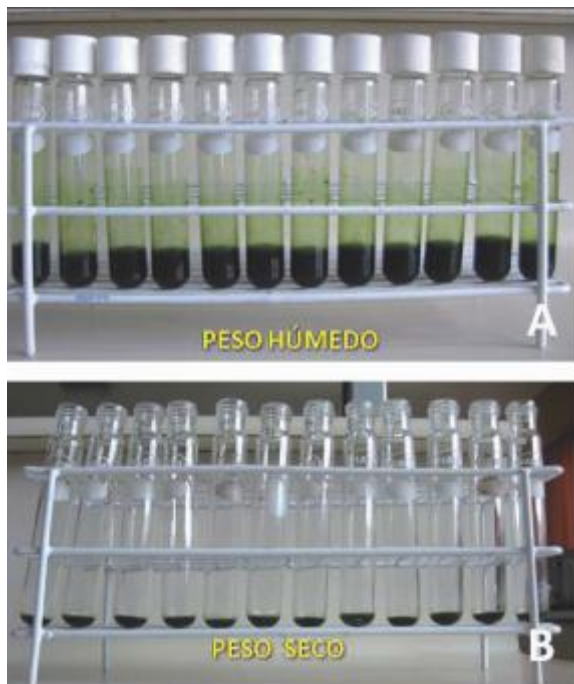


Figura 5. Recuperación de biomasa por centrifugación para: A) La estimación del peso húmedo. B) Obtención de biomasa seca deshidratada

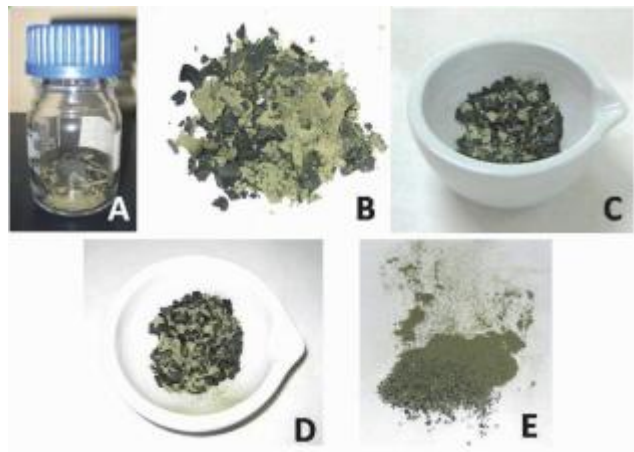


Figura 6. Recuperación de biomasa seca de *Scenedesmus* spp.

Cuadro 5

Resultados de la biomasa húmeda y biomasa seca del cultivo de *Scenedesmus* spp.

TUBO	PESO TUBO	BIOMASA HUMEDA (gr/50 ml)	PESO TUBO BIO.SEC.	BIOMASA SECA (80°C) (gr/50 ml)
1	12.938	13.131	12.949	0.011
2	12.589	12.78	12.601	0.012
3	12.473	12.654	12.484	0.011
4	12.782	12.984	12.792	0.01
5	12.965	13.151	12.975	0.01
6	12.443	12.631	12.452	0.009
7	12.782	12.966	12.789	0.007
8	12.667	12.87	12.674	0.007
9	12.698	12.871	12.705	0.007
10	12.582	12.792	12.59	0.008
11	12.705	12.888	12.713	0.008
12	12.678	12.857	12.684	0.006
13	12.649	12.846	12.656	0.007
14	12.603	12.797	12.609	0.006
15	12.761	12.954	12.767	0.006
16	12.711	12.904	12.718	0.007
<b>PROMEDIO</b>		<b>0.190625</b>		<b>0.00825</b>
<b>DESV. EST.</b>		<b>0.009646243</b>		<b>0.001983263</b>
		<b>0.0038125 g/ml</b>		<b>0.000165 g/ml</b>

Cuadro 6

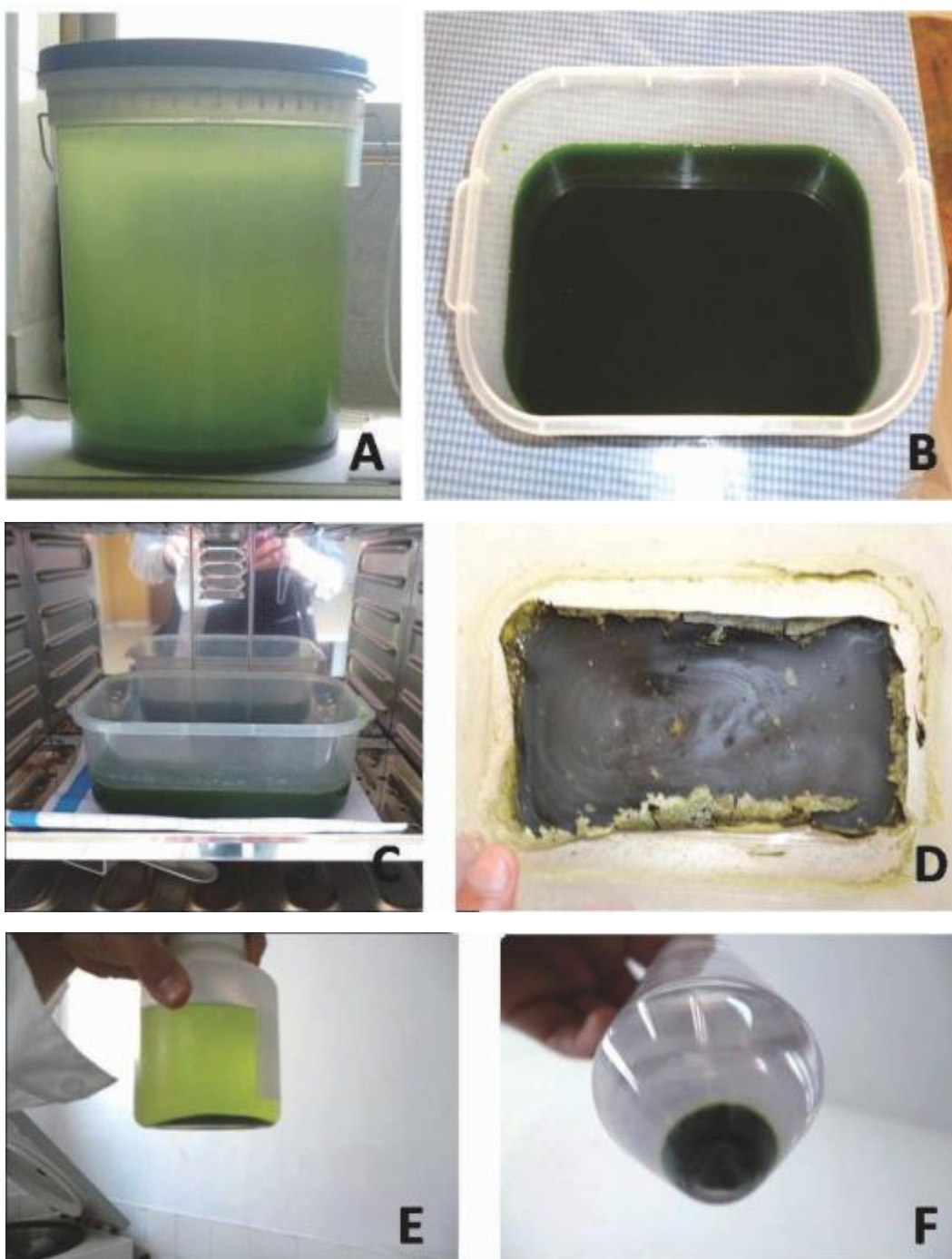
Recuentos microbianos de *Scenedesmus* spp. a través de la cámara de Neubauer, en el día 30 en cultivos de Nitrofoska Verde® al 0,01%.

	Lecturas microscópicas				
	Lect.1	Lect.2	Lect.3	Lect.4	Lect.5
	12	39	20	34	15
	26	22	17	23	58
	28	26	23	36	24
	25	14	27	28	45
	26	16	26	40	25
<b>PROMEDIO</b>	<b>23.4</b>	<b>23.4</b>	<b>22.6</b>	<b>32.2</b>	<b>33.4</b>
<b>DESV.EST.</b>	<b>6.46529195</b>	<b>9.93981891</b>	<b>4.15932687</b>	<b>6.72309453</b>	<b>17.586927</b>
<b>X 25</b>	<b>587.5</b>	<b>585</b>	<b>565</b>	<b>805</b>	<b>835</b>
<b>X 10000</b>	<b>5875000</b>	<b>5850000</b>	<b>5650000</b>	<b>8050000</b>	<b>8350000</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>6755000</b>	<b><math>6.75 \times 10^6</math> cel/ml.</b>			
<b>DESV.ESTA.</b>	<b>1326225.85</b>				



## RECUPERACIÓN DE LA BIOMASA DE *Scenedesmus spp.*

El trabajar con volúmenes mayores de cultivo implica el inconveniente del gasto energético que pudiera acarrear la centrifugación, lo cual resultaría contraproducente en un proceso donde se pretende minimizar costos. Por ello es que se optó por la recuperación de la biomasa a través de la sedimentación por gravedad durante al menos una semana de reposo (figura 7), aunque tiene la desventaja el tiempo que ello involucra.



**Figura 7.**

Recuperación de la biomasa de *Scenedesmus spp.* a través de diferentes metodologías.

A) Sedimentación (gravedad) de *Scenedesmus spp.* al término de una semana en reposo. B) Recuperación de la pasta húmeda. C) Deshidratación de biomasa húmeda en incubadora a 80°C. D) Obtención de pasta deshidratada de *Scenedesmus spp.* E) y F) Recuperación de biomasa por centrifugación.

## RECUPERACIÓN DE ACEITE DE *Scenedesmus spp.*

La extracción de lípidos con solventes químicos ha sido utilizada tradicionalmente para obtener lípidos de fuentes animales y vegetales. Para el caso de las microalgas, el solvente es por lo general adicionado a la biomasa seca aunque en algunos casos es utilizado en biomasa con cierta cantidad de agua, lo que disminuye los costos globales del proceso, pero disminuye también la eficiencia de la extracción.

Una gran variedad de solventes orgánicos suele ser utilizada en la extracción de aceite de microalgas, siendo los más populares el hexano y el etanol mediante una mezcla hexano-etanol es posible extraer más del 98% de los ácidos grasos presentes en la biomasa seca (Richmond 2004); sin embargo, al ser el etanol un buen solvente de extracción, su selectividad hacia los lípidos es relativamente baja comparada con otros solventes, por lo que en extracciones con etanol pueden aparecer otros componentes de las microalgas como azúcares, pigmentos o aminoácidos.

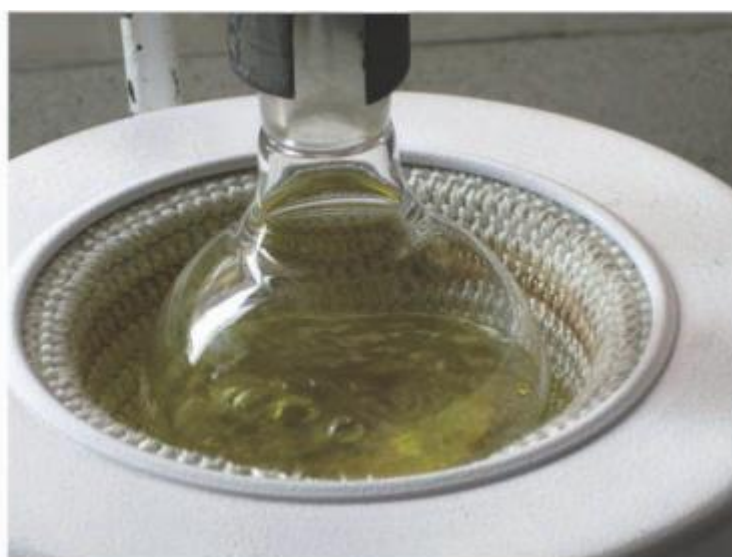
En la extracción de aceites a partir de la biomasa seca de *Scenedesmus spp.* se empleó el método de Soxhlet (figura 8), obteniendo un rendimiento medio del 6,323% de aceite recuperado producto de tres muestras diferentes. En esta obtención, empleamos como solvente orgánico el hexano, aunque la recuperación está muy por debajo de los niveles medios señalados por la literatura para otras especies de *Scenedesmus*; así por ejemplo, se reporta para *Scenedesmus quadricauda* 1,9%, mientras que para *Scenedesmus dimorphus* entre 16 – 40% de lípidos. Todo ello podemos atribuirle a varios aspectos, como puede ser el proceso de recuperación, dado que no se efectuó ningún tratamiento previo como la disrupción celular; por otro lado, la recuperación varía en función al método de extracción elegido y a la vez es bastante variable, en función de las condiciones físico-químicas en que se practicaron los cultivos.

El sistema de extracción soxhlet ha sido ampliamente utilizado en la extracción de aceite de microalgas (Manirakiza et al. 2001; Li et al 2008). Este sistema se compone de un balón donde se encuentra un solvente

orgánico que es calentado hasta ebullición, un tubo de extracción Soxhlet donde es colocada la muestra, la cual va contenida en un cartucho de celulosa y un condensador. Después de evaporarse el solvente orgánico es condensado y cae al tubo Soxhlet, en el cual extrae el aceite contenido en la biomasa hasta que el tubo se llena. Cuando el tubo está lleno de solvente, este es sifonado hasta el balón que contiene el resto de solvente y se repite el proceso. La pureza del aceite, al final del proceso, es relativa y depende de muchos factores. Entre ellos encontramos el tipo de alga cultivada, la cantidad de nutrientes en el medio, la radiación de energía solar, entre otras.

Una gran cantidad de solventes se han utilizado como solventes de extracción en el método Soxhlet, el empleo de éter de petróleo se recomienda por ser este un solvente no polar, que será selectivo al extraer lípidos no polares de las microalgas como los triglicéridos, los cuales son lípidos ideales para la producción de biodiesel; el éter etílico también posee esta propiedad y ya ha sido utilizado para la microalga *Neochloris oleobundans* (Li et al. 2008). El inconveniente que presentan los éteres es su alta volatilidad, lo que conlleva una significativa pérdida de solvente durante el proceso de extracción (Li et al. 2007).

El solvente hexano ha sido evaluado como solvente de extracción para *Scenedesmus spp.* en el sistema soxhlet con resultados interesantes (Anderson et al 2008). El hexano es relativamente económico, fácil de recuperar después de la extracción y posee selectividad hacia los lípidos neutros; también puede ser utilizado en mezcla con isopropanol. Esta mezcla se considera segura a escala industrial, eficiente en la extracción de ácidos grasos y de baja toxicidad. La mezcla diclorometano/hexano permite aumentar la cantidad de lípidos totales extraídos, si el objetivo es una gran eficiencia y la selectividad no es prioritaria. Otra mezcla que se ha utilizado en la extracción Soxhlet para microalgas es una combinación de diclorometano/metanol, la cual es muy eficiente y recupera una gran cantidad de lípidos neutrales (Mousdale, D. 2008).



**Figura 8.** Recuperación de aceites a partir de la biomasa seca de *Scenedesmus spp.* a través del método de Soxhlet.

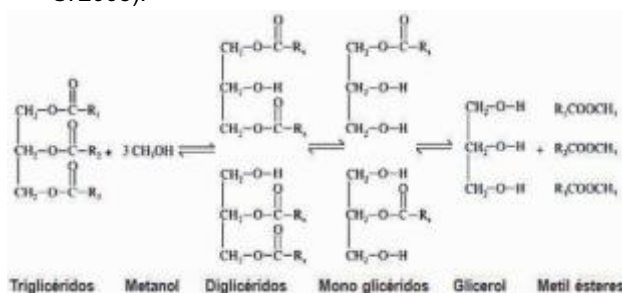
**Cuadro 7**  
Rendimiento promedio en la recuperación de aceites a partir de la biomasa seca de *Scenedesmus spp.*

Biomasa Deshidr.	Lípidos (gr.)	Lípidos (%)	Promedio %
9.2	0.384	4.174	
13.7	0.8988	6.561	
12.4	1.0211	8.235	<b>6.3233</b>

### OBTENCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE *Scenedesmus spp.*

Existen diversas metodologías para la producción de biodiesel, cuatro de ellas han sido estudiadas exhaustivamente: uso directo de aceites o mezclas de éstos con diesel fósil, microemulsiones, pirólisis y transesterificación (Arredondo et al. 1991). La aplicación de las tres primeras alternativas en motores diesel es poco práctica e insatisfactoria, ya que ocasiona problemas tales como la obstrucción de los inyectores, la formación de depósitos de carbono, la combustión incompleta, el golpeteo en el motor, el desgaste excesivo del mismo, el daño del lubricante y, en el caso específico de la pirólisis, la eliminación de los beneficios ambientales inherentes al uso de combustibles oxigenados (Anderson et al. 2008).

En nuestro caso se optó por la obtención de biodiesel como producto de un proceso de transesterificación de aceites triglicéridos con alcoholes monohidratados, en el cual se intercambia el grupo alcoxi (grupo alquilo unido a un átomo de oxígeno, es decir, RO) de un éster por otro alcohol, como se ilustra en la figura 9 (Yusuf Chisti. 2008). Esta es la parte más importante del proceso en la producción de biodiesel, por ello se debe cuidar todas las posibles variables de la reacción que puedan afectar el contenido final. Entre las variables a considerar, está la concentración y tipo de catalizador, la acidez, la humedad, la relación molar de alcohol / aceite, el tiempo de reacción y temperatura (Hossain, S. 2008).



**Figura 9.**  
Reacción general de transesterificación en la obtención de biodiesel.

En nuestra experiencia, se ha trabajado bajo condiciones ideales de operación propuestas por otros autores, como son temperatura 60°C, agitación 200 rpm, tiempo de la reacción 90 m. Producto de ello es que se obtuvo una suspensión altamente densa, que al cabo de algunos días y/o alternativamente puede ser centrifugada para obtener el biodiesel (Chisti 2007, 2008). Las dos fases que se forman son consecuencia del diferencial de densidad, el biodiesel mostró una densidad de 0,82 g/cm<sup>3</sup> mientras que en la parte inferior se deposita la glicerina, con una densidad de

1,261 g/cm<sup>3</sup> (Figura 10 y 11).

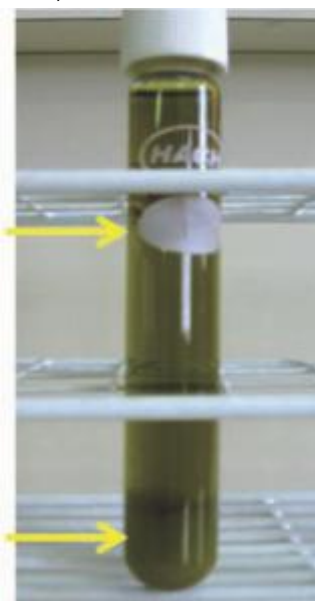
El rendimiento de biodiesel obtenido se presenta en el cuadro 8, y fue del 85,034% como promedio, cifra muy próxima a la obtenida por otros autores. Durante el proceso de transesterificación, este puede verse afectado en el momento en que haya una mínima parte de agua; los catalizadores de la reacción de transesterificación son normalmente básicos (NaOH, KOH) y van a reaccionar rápidamente con los ácidos grasos y con los alcoholes en presencia de agua para formar otra clase de sustancias, "jabones". La saponificación es un proceso de hidrólisis en medio básico, por el cual se transforma un éster (ácido graso) en un alcohol y en la sal correspondiente del ácido carboxílico (Fischer et.al. 2008).

**BIODIESEL DE *Scenedesmus spp.***

Densidad Media:  
0,82 g/cm<sup>3</sup>

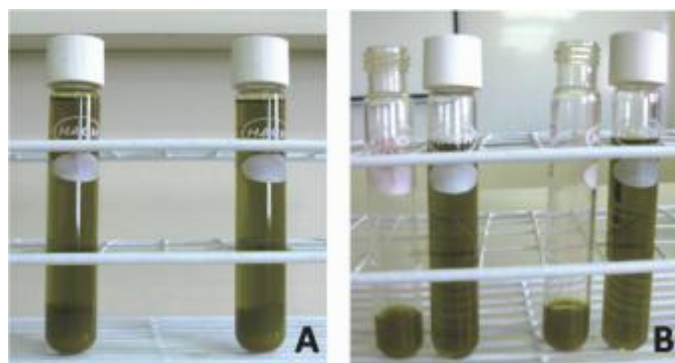
**GLICEROL DE *Scenedesmus spp.***

Densidad Media:  
1,261 g/cm<sup>3</sup>



**Figura 10.**  
Formación de dos fases durante la obtención de biodiesel a partir de *Scenedesmus spp.*





**Figura 11.**  
Recuperación del biodiesel a partir de *Scenedesmus spp.*

**Cuadro 8**  
Rendimiento en la obtención de biodiesel a partir del aceite de *Scenedesmus spp.*

TUBO VACIO	PESOS DE:			TUBO GLICEROL	GLICEROL	BODIESEL	BODIESEL RECUPERADO (%)	
	TUBO + ACEITE + METANOL + CATALIZADOR	ACEITE + METANOL + CATALIZADOR	CENTRIFUG. Y SEPARACIÓN DE FASES					
T1	12.56	23.764	11.203	" + "	14.318	1.757	9.446	84.316
T2	12.48	23.281	10.805	" + "	14.103	1.627	9.178	84.942
T3	12.55	23.586	11.034	" + "	14.187	1.635	9.399	85.182
T4	12.45	23.723	11.275	" + "	14.565	2.117	9.158	81.224
T5	12.87	23.487	10.616	" + "	13.985	1.114	9.502	89.506
PROMEDIO RENDIMIENTO DE BODIESEL (%) =							85.034	
DESVIACIÓN ESTANDAR =							2.96060703	

#### IV. Conclusiones

1. De la formulaciones ensayadas en base al abono foliar NPK, se determinó que la concentración al 0.01%, resultó ser la más adecuada para la máxima obtención de biomasa.
2. El rendimiento de biomasa húmeda y seca fue de 3.81252 gr/Lt y 0.165 gr/Lt respectivamente.
3. El rendimiento de aceite de *Scenedesmus spp.*, a partir de la biomasa seca fue de 6.323 %.
4. El rendimiento de biodiesel a partir del aceite de *Scenedesmus spp.* fue de 85.034 %.
5. La recuperación de aceite resulta en etapa determinante en el rendimiento final de biodiesel.

#### V. Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Vicerrectorado de Investigación y conjuntamente a la Oficina de Investigación de la UPAO por posibilitar la financiación del presente proyecto. Asimismo, a todos los miembros del equipo de trabajo del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UPAO.

#### VI. Referencias bibliográficas

1. Al-Zuhair S (2007) Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels Bioprod. Bioref.* 1: 57-66.
2. Andersen RA (2005) *Algal Culturing Techniques*. Phycological Society. Elsevier Academic Press. Amsterdam. p. 578.
3. Anderson, Jordan & Sorek, Benjamin. (2008). *Microalgae: The fuel of tomorrow*. University of Pittsburg.
4. Arredondo BO & Vázquez-Duhalt R (1991). Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. 17: 99-111.

5. Carrere, R. [2006]. *Los Biocombustibles*. Boletín No. 112 [En línea] Uruguay, Movimiento Mundial por los bosques Tropicales WRM [ref. del 12 de Mayo de 2007]. Disponible en sitio web: <<http://www.wrm.org.uy/boletin/112/boletin112.pdf>>
6. Chisti Y (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.
7. Chisti Y (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26: 126-131.
8. Clarimón, L., C. Fernández y B. Sánchez [2005]. *Informe sobre el empleo de combustibles renovables. Biodiesel*. [En línea] Aragón, España. Departamento del Medio Ambiente CC.OO. [ref. del 21 de Abril de 2007]. Disponible en Web: <[http://www.aragon.ccoo.es/doc/informe\\_biodiesel.pdf](http://www.aragon.ccoo.es/doc/informe_biodiesel.pdf)>
10. Csogor, Z. Herrenbauer, M. Schmidt, K. Posten, C. (2001). Light distribution in a novel photobioreactor – modelling for optimization. *Journ Appl Phycol* 13: 325–333,
11. Dismukes GC, Carrieri D, Bennette N, Ananyev GM & Posewitz MC (2008) Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 235- 240.
12. Fairless D (2007) The little shrub that could – maybe. *Nature*, 449: 652-655.
13. Fernández, J. [2006]. 5as Jornadas Abulenses de *Energías Renovables: Materias primas para la producción de biocombustibles sólidos* [En línea]. Avila Energy [ref. del 18 de Abril de 2007]. Disponible en el sitio web <<http://www.avilaenergy.com/pdf/5jornadas/Ponencias/M1P3.pdf>>
14. Fischer CR, Klein-Marcuschamer D & Stephanopoulos G (2008) Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab. Eng.* 10: 295-304.
15. HOSSAIN, Shariff. Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. Science publication (3):250-254, 2008. ISSN: 1553-3468.
16. Lee, C.G. & B. O. Palsson (1995). Light Emitting Diode-Based Algal Photobioreactor with
17. Lee AK, Lewis DM & Ashman P (2009) Microbial flocculation, a potentially lowcost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J. Appl. Phycol.* 21: 559-567.
18. Li Q., Du W., Liu D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotech.* 80:749–756.
19. Li X, Xu H & Wu Q (2007) Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 98: 764-771.
20. Manirakiza, P. Covaci A. and Schepens P. (2001). Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of food composition and analysis*.
21. Mousdale, D. M. (2008). *Biofuels: Biotechnology, Chemistry, and Sustainable Development*. Primera Edición. CRC Press.
22. Richmond, A. & Hu, Q. (1997). Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1 63-65.
23. SAGPYA [2006]. *Perspectiva de los Biocombustibles en Argentina* [En línea]. Programa Nacional de Biocombustible en Argentina. Publicado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos [ref. del 15 de Abril de 2007]. Disponible en el sitio web: <<http://www.rlc.fao.org/prensa/activi/agroenergia/almada.pdf>>
24. Sánchez M., J.I. [2006]. *Desarrollo de biocombustibles en Castilla y León* [En línea]. España, Universidad de Salamanca y Consejo Económico y Social CES [ref. del 14 de Abril de 2007]. Disponible en el sitio web: <<http://www.cescyl.es/publicaciones/coleccion.php>>
25. Stratta, J. [2000]. *Biocombustibles: Los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel* [En línea]. Argentina, Departamento de Capacitación y Desarrollo del Mercado de la bolsa de Comercio de Rosario [ref. del 15 de Abril de 2007]. Disponible en el sitio: <<http://www.bcr.com.ar/pagcentrales/publicaciones/images/pdf/biocombustibles.pdf>>
26. Yusuf Chisti. 2008. Biodiesel From Microalgae Beats Bioethanol. School of Engineering, Massey University, Private Bag 11 222, Palmerston North, New Zealand.