

## CULTIVO DE MICROALGAS: BASES CIENTÍFICAS PARA EMPRENDIMIENTOS BIOENERGÉTICOS EN EL ESTUARIO DE BAHÍA BLANCA (BS.AS., ARGENTINA)

Popovich, Cecilia Angelines<sup>1,2,3\*</sup>, Leonardi, Patricia Inés<sup>2,3</sup>

### RESUMEN

El Estuario de Bahía Blanca constituye una pieza fundamental para el desarrollo de la Provincia de Buenos Aires y el país. Además de su valor intrínseco, este ambiente muestra numerosas ventajas para futuros emprendimientos relacionados con la producción de biomasa microalgal con fines bioenergéticos. Específicamente, este trabajo presenta resultados relacionados con procesos de cultivo de diatomeas aisladas de dicho Estuario, destinados a la producción de biomasa rica en triglicéridos (TAG), aptos para la obtención de biodiesel, bajo un concepto de biorrefinería. Entre las especies estudiadas, *Halamphoracoffeaeformis* alcanzó un rendimiento de biomasa de hasta 44,1 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en piletas tipo *raceway*, lo cual sugiere un balance energético positivo. Dentro de este proceso, se obtuvieron porcentajes de aceites de hasta 54,4% de la biomasa y se caracterizaron bioproductos con potenciales aplicaciones industriales, como la sílice y sustancias poliméricas extracelulares. El biodiesel obtenido a partir de aceite microalgal presentó un 94% de metilésteres y características acordes con estándares de calidad. Los resultados obtenidos representan una base científica de referencia para fomentar el desarrollo de emprendimientos productivos sustentables en el campo de la bioenergía en la zona de Bahía Blanca, y extensivamente en la Provincia de Buenos Aires.

### 1. INTRODUCCIÓN

La disminución de las reservas petroleras y la contaminación causada por la quema de los combustibles fósiles constituyen dos grandes problemas que enfrenta el mundo en las áreas energética y medioambiental. Así, la búsqueda de energías renovables ha sido orientada hacia la producción de grandes cantidades de biomasa como alternativa a los combustibles fósiles. En las últimas décadas, el interés por las microalgas como una fuente potencial para la producción de biocombustibles de tercera generación ha

1-Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS)-(CIC-UPSO), Bahía Blanca, Argentina. 2-Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) (CONICET-UNS), Bahía Blanca, Argentina. 3-Universidad Nacional del Sur (UNS), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Bahía Blanca, Argentina. [\\*bmpopovi@criba.edu.ar](mailto:bmpopovi@criba.edu.ar)

aumentado considerablemente (Rawat et al., 2013). Algunas especies comúnmente llamadas oleaginosas, bajo determinadas condiciones de estrés, pueden acumular altos contenidos de triglicéridos (TAG) (Hu et al., 2008; Damiani et al., 2010; Leonardi et al., 2011; Popovich et al., 2012 a y b; Damiani et al., 2014; Bielsa et al., 2016; Martín et al., 2016), los cuales son la materia prima ideal para la producción de biodiesel. Además, estos microorganismos fotosintéticos poseen numerosas ventajas con respecto a los cultivos oleaginosos usados convencionalmente para la producción de biodiesel: pueden duplicar la densidad poblacional en pocos días, no compiten por alimentos, pueden utilizar gases de combustión industrial y muchas especies pueden cultivarse en aguas salobres o residuales. Sin embargo, si bien la producción de biodiesel a partir de aceites microalgales es técnicamente factible, su producción aún no es competitiva a nivel industrial. Algunos desafíos comprenden: la selección de especies microalgales robustas, el desarrollo de sistemas de cultivos sustentables y la puesta a punto de procesos ingenieriles de producción de biodiesel a partir de microalgas. Una estrategia sugerida para mejorar los costos de producción, es la selección de especies nativas capaces de producir TAG y bioproductos de valor agregado, los cuales mejoran la rentabilidad final del proceso (Rawat et al. 2013).

El Estuario de Bahía Blanca (Fig. 1a) constituye una pieza fundamental para el desarrollo de la Provincia de Buenos Aires y el país. Además de su valor intrínseco (Popovich et al., 2008), este ambiente presenta numerosas ventajas para futuros emprendimientos relacionados con la producción de microalgas con fines bioenergéticos. Entre ellas se pueden mencionar, la presencia de extensas planicies de mareano aptas para la agricultura y de fácil acceso (Fig. 1b); la disponibilidad de agua salobre necesaria para el sostenimiento de los cultivos; y la presencia de una zona portuaria que ofrece servicios ágiles, flexibles y adaptables a los requerimientos y cambios tecnológicos que exigen las economías internacionales. Por otro lado, Bahía Blanca ha sido considerada una de las ciudades argentinas que mayor cantidad de gases de efecto invernadero lanza a la atmósfera (Ferraro et al., 2013). Estos autores, determinaron que las emisiones de CO<sub>2</sub> se deben principalmente a los consumos del sector industrial de la ciudad, el cual se concentra, en su mayor parte, en el veril norte de la zona interna del Estuario (Fig. 1c).

1-Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS)-(CIC-UPSO), Bahía Blanca, Argentina. 2-Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) (CONICET-UNS), Bahía Blanca, Argentina. 3-Universidad Nacional del Sur (UNS), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Bahía Blanca, Argentina. [\\*bmpopovi@criba.edu.ar](mailto:bmpopovi@criba.edu.ar)

Considerando este problema ambiental, el desarrollo de cultivos masivos de microalgas en cercanías de fuentes de emisión de CO<sub>2</sub> permitiría, de una manera ecológica, contribuir a mitigar los gases de efecto invernadero en la región, sentando un precedente innovador en estos temas en nuestro país.

Así, el objetivo de este trabajo es presentar resultados en relación con el cultivo a escala piloto-experimental de microalgas aisladas del Estuario de Bahía Blanca, tendientes a la producción de aceites aptos para biodiesel y bioproductos con potenciales aplicaciones industriales. Estos estudios son indispensables para contribuir al desarrollo de tecnologías en el campo de la bioenergía en la región y el país.

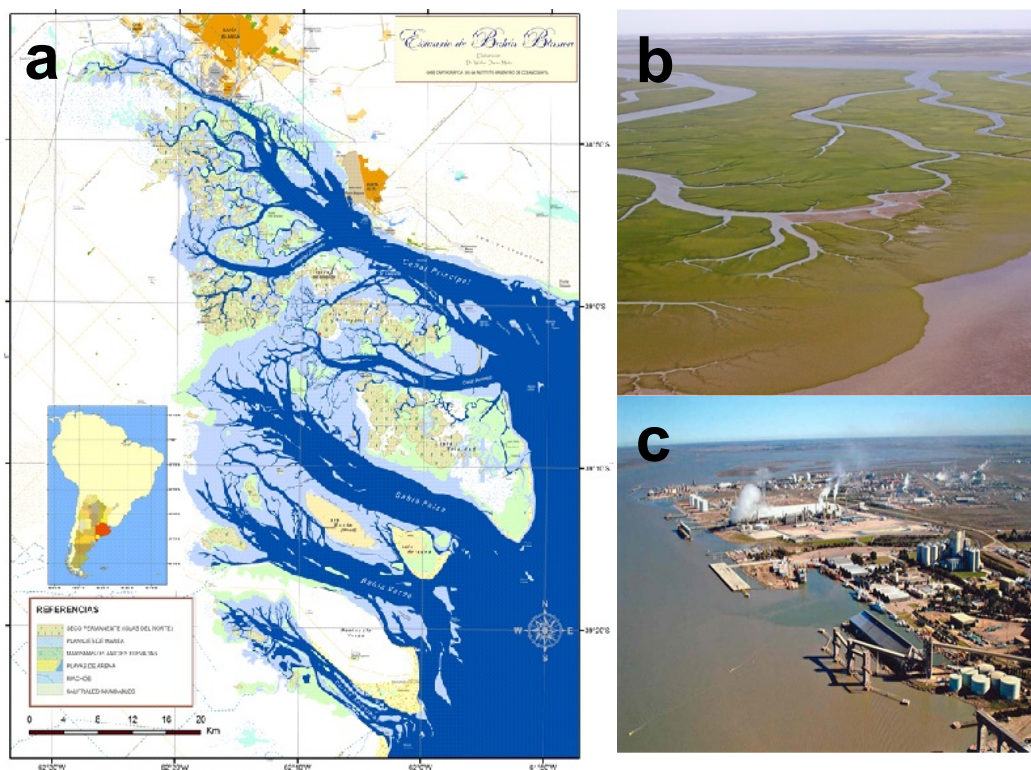


Figura 1: Localización del Estuario de Bahía Blanca (a); planicies de marea con potencialidad para el emplazamiento de cultivos de microalgas a cielo abierto (b); polo industrial (c). Fuentes: <http://www.whsrn.org> (a; b); <http://argentinainvestiga.edu.ar> (c)

1-Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS)-(CIC-UPSO), Bahía Blanca, Argentina. 2-Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) (CONICET-UNS), Bahía Blanca, Argentina. 3-Universidad Nacional del Sur (UNS), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Bahía Blanca, Argentina. [\\*bmpopovi@criba.edu.ar](mailto:bmpopovi@criba.edu.ar)

## 2. METODOLOGÍA

Las investigaciones en esta temática incluyen: 1) aislamiento y selección de especies microalgales nativas oleaginosas del Estuario de Bahía Blanca; 2) optimización de las condiciones de cultivo para la producción de biomasa, en fotobiorreactores columnares y producción de aceites, en piletas tipo *raceway*; 3) evaluación del diseño, construcción y operación de los sistemas de cultivo y de las técnicas de cosecha de la biomasa; 4) puesta a punto de metodologías de extracción y caracterización de aceites y otros bioproductos y 5) producción y caracterización de biodiesel. Durante las experiencias se evalúan distintos parámetros relacionados con: A) la producción de biomasa (velocidad de crecimiento específica, peso seco, cinética de fluorescencia de la clorofila *a*); B) producción de lípidos aptos para biodiesel (contenido de lípidos totales [%LT], cinética de lípidos neutros por fluorescencia con Rojo Nilo; fraccionamiento de los lípidos totales en lípidos neutros y polares; análisis del perfil de los ácidos grasos por cromatografía gaseosa); y C) cinética de los nutrientes inorgánicos (% de Remoción de nitrato, fosfato, y silicatos del medio).

## 3. RESULTADOS

Las cepas de microalgas aisladas del Estuario de Bahía Blanca se mantienen bajo condiciones controladas de laboratorio en cámaras de cultivo. A partir de estos cultivos *stock*, se inicia el proceso de escalado, con una primera etapa en Erlenmeyers (Fig. 2a), la cual se mantiene en crecimiento exponencial mediante al aporte de nutrientes y aireación enriquecida con CO<sub>2</sub>. Estos cultivos son transferidos a fotobiorreactores columnares (FBRs)(Fig. 2b) con el fin de optimizar la producción de biomasa. Por último, los cultivos de los FBRs son usados como inóculo para piletas circulares de poca profundidad denominadas *raceways*(Fig. 2c), en las cuales los cultivos son sometidos a condiciones de estrés, con el fin de estimular la acumulación de TAG y otros bioproductos. En el caso particular de la diatomea *Halamphoracoffeaeformis*, aislada del Estuario de Bahía Blanca, los procesos de cultivo híbrido (fotobiorreactor y *raceway*) arrojaron una producción de biomasa por unidad de área de 44,1 (±1,1) g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Esta

1-Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS)-(CIC-UPSO), Bahía Blanca, Argentina. 2-Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) (CONICET-UNS), Bahía Blanca, Argentina. 3-Universidad Nacional del Sur (UNS), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Bahía Blanca, Argentina. [\\*bmpopovi@criba.edu.ar](mailto:bmpopovi@criba.edu.ar)

producción fue superior al valor establecido ( $17 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) para obtener una Tasa de Retorno Energético  $>1$  (Levitan et al., 2014). Estos valores indican que el proceso de cultivo a escala piloto-experimental presentó un balance energético positivo, por lo cual se espera optimizar parámetros técnicos y económicos aplicables a mayor escala. Es importante remarcar, que los medios de cultivo son sustentados con agua de mar del estuario, lo que contribuye a disminuir los costos de producción.

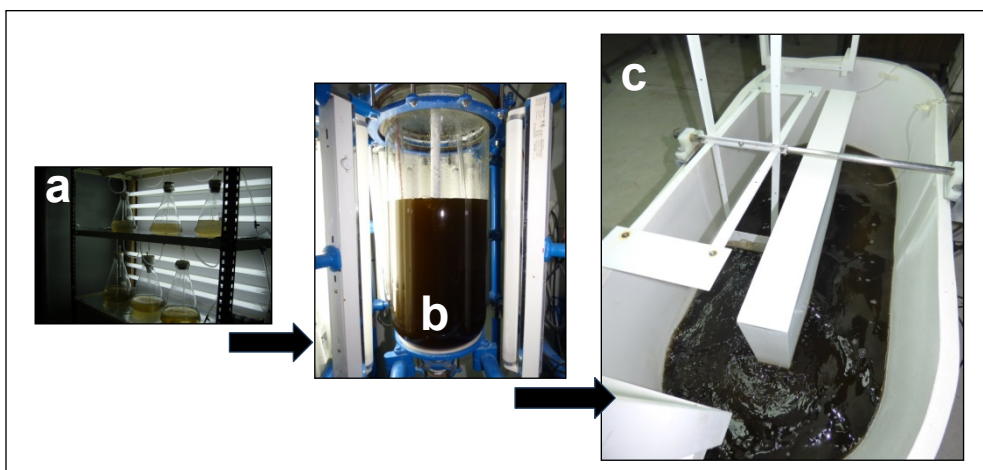


Figura 2: Distintas etapas de cultivo. Cultivo en Erlenmeyers bajo condiciones ambientales controladas (a); producción de biomasa en fotobiorreactor (b); producción de biomasa rica en triglicéridos en pileta tipo *raceway* (c). El color que adopta el cultivo se debe a la presencia de pigmentos accesorios color pardo-dorado propios de las diatomeas. Fuente: LEBBA

Durante el proceso de cultivo se monitorean distintos parámetros para determinar los niveles máximos de producción de biomasa y de lípidos neutros, aptos para biodiesel. La cosecha de la biomasa se realiza por autofloculación del cultivo. Este método implica la sedimentación natural de las células, la separación del sobrenadante por sifón y la recuperación de la biomasa concentrada en el fondo de la pileta por raspado. El sobrenadante se recicla para el desarrollo de otros cultivos. La optimización de este método de cosecha representa una ventaja económica para la etapa *down-stream* del proceso productivo.

1-Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS)-(CIC-UPSO), Bahía Blanca, Argentina. 2-Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) (CONICET-UNS), Bahía Blanca, Argentina. 3-Universidad Nacional del Sur (UNS), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Bahía Blanca, Argentina. [\\*bmpopovi@criba.edu.ar](mailto:bmpopovi@criba.edu.ar)

Una vez obtenido el *pellet* celular, una pequeña parte de la biomasa se liofiliza para realizar las determinaciones químicas (contenido de lípidos totales (LT), lípidos neutros (LN), lípidos polares y composición de los ácidos grasos), mientras que el resto de la biomasa se destina a la producción de biodiesel y recuperación de bioproductos de valor agregado.

En la Tabla 1 se muestran algunos resultados obtenidos a partir del cultivo de cuatro especies de diatomeas aisladas de la zona interna del Estuario de Bahía Blanca (Popovich et al., 2012b, Bielsa et al., 2016; Martín et al. 2016). En *Halamphoracoffeaeformis*, la concentración de lípidos totales alcanzó valores de hasta 54,4% respecto al peso seco de la biomasa, siendo los lípidos neutros o TAG la fracción lipídica más importante (86-90 % respecto a los lípidos totales). Además, en las cuatro especies la caracterización de los ácidos grasos mostró elevadas concentraciones de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, principalmente ácido palmítico y ácido palmitoleico, respectivamente, los cuales otorgan excelentes cualidades a los aceites destinados a biodiesel, dado que aumentan el número de cetano y mejoran las propiedades del biocombustible a bajas temperaturas (Popovich et al., 2012a, Bielsa et al., 2016; Martín et al., 2016).

Tabla 1. Especies aisladas del Estuario de Bahía Blanca: contenido de lípidos totales (LT) en % de peso seco libre de cenizas (PSLC); contenido de triglicéridos (TAG) respecto a los lípidos totales (%); bioproductos cuantificados y caracterizados; y citas de trabajos publicados por investigadores del LEBBA.

\* datos transformados de Popovich et al., 2012 a [1]; Bielsa et al., 2016 [2]; Martín et al., 2016 [3])

Especies nativas	Lípidos totales (% PSLC)	TAG (% LT)	Bioproductos	Citas
<i>Navicula gregaria</i>	30*	76	Sílice	[1]
<i>Skeletonemacostatum</i>	27,5*	65	Sílice	[1]
<i>Naviculacincta</i>	41	90	Sílice - EPS	[2]

1-Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS)-(CIC-UPSO), Bahía Blanca, Argentina. 2-Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) (CONICET-UNS), Bahía Blanca. Argentina. 3-Universidad Nacional del Sur (UNS), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Bahía Blanca. Argentina. [\\*bmpopovi@criba.edu.ar](mailto:bmpopovi@criba.edu.ar)

Los ensayos de producción de biodiesel abarcan, análisis con metanol supercrítico (Soto et al., 2012; Montero et al. 2013, Hegel et al., 2017) y catálisis ácida. Con respecto a este último procedimiento, se está poniendo a punto una metodología a partir de aceites extraídos de la biomasa microalgal. Los resultados son prometedores, dado que han arrojado eficiencias de 94% de metilésteresen el biodiesel producido y propiedades que se ajustan a los estándares de calidad del biodiesel comercial (Estándares americano[ASTM D6751-08] y europeo [EN 14214]).Estas características estimulan el uso del biodiesel obtenido para mezcla con diésel de petróleo.

Los estudios tendientes a la identificación de bioproductos indicaron que las especies de diatomeas *Naviculacincta* y *Halamphoracoffeaeformis* producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en forma simultánea con la producción de TAG. Dichas sustancias presentan gran interés en procesos de biorremediación, por su capacidad de absorber metales pesados del medio y en la industria farmacéutica, por su potencial uso para la liberación controlada de drogas (Bielsa et al., 2016). Además, el cultivo de diatomeas es una fuente natural de sílice, dado que sus paredes celulares están formadas por sílice amorfo, el cual puede recuperarse como un residuo, luego de la extracción del aceite (Martín et al., 2016). Este compuesto presenta numerosas aplicaciones industriales, como por ejemplo en: sistemas de filtración, abrasión, insecticidas ecológicos, biosensores y nanotecnología, entre otros.

#### 4. CONCLUSIONES

La búsqueda de nuevas fuentes de energías renovables y sustentables, así también como la necesidad de contar con otras fuentes de bioproductos de valor agregado, han convertido la producción de biomasa microalgal en una tecnología emergente de interés mundial. En la actualidad, cerca del 80% de la demanda energética mundial es satisfecha con combustibles fósiles. Sin embargo, se estima que el uso continuo de estos combustibles producirá el agotamiento de estos recursos en aproximadamente 50 años y que el futuro de la humanidad dependerá solamente de fuentes de energía renovables y

1-Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS)-(CIC-UPSO), Bahía Blanca, Argentina.2-Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) (CONICET-UNS), Bahía Blanca. Argentina. 3-Universidad Nacional del Sur (UNS), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Bahía Blanca. Argentina. [\\*bmpopovi@criba.edu.ar](mailto:bmpopovi@criba.edu.ar)

ambientalmente no dañinas. Si bien la producción de biodiesel a partir de aceites microalgales es técnicamente factible, su producción a nivel industrial aún requiere de investigación y desarrollo para lograr una tecnología sustentable. En particular, los resultados presentados en este trabajo representan una base empírica útil e indispensable para evaluar la viabilidad técnica, económica y ambiental de biorrefinerías microalgales en el Estuario de Bahía Blanca (Pcia. de Buenos Aires).

## 5. REFERENCIAS

- Bielsa, GB.; Popovich, CA.; Rodríguez, MC.; Martínez, AM.; Martín, LA.; Matulewicz, MC.; Leonardi, PI, 2016. Simultaneous production assessment of triacylglycerols for biodiesel and exopolysaccharides as valuable co-products in *Naviculacincta*. *Algal Research*, 15, 120-128.
- Damiani, MC; Popovich, CA; Constenla, D; Leonardi PI, 2010. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 101: 3801-3807.
- Damiani, MC, Popovich, CA, Constenla, D, Martínez, AM, Doria, E, Longoni, P, Cella, R, Nielsen, E, Leonardi, PI, 2014. Triacylglycerol content, productivity and fatty acid profile in *Scenedesmus acutus* PVUW12. *Journal Applied Phycology*, 26:1423-1430.
- Ferraro, R; Gareis, C; Zulaica, L, 2013. Aportes para la estimación de la Huella de Carbono en los grandes asentamientos urbanos de Argentina. Cuadernos de Geografía, Revista Colombiana de Geografía; Bogotá; 22:87– 106.
- Hegel P; Martín L; Popovich CA; Damiani MC; Pancaldi S; Pereda S; Leonardi PI, 2017. Biodiesel production from *Neochloris oleoabundans* by supercritical technology. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*. En prensa.
- Hu, Q; Sommersfeld, M; Jarvis, E; Ghirardi, M; Posewitz, M; Seibert, M; Darzins, A 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54, 621–639.

1-Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS)-(CIC-UPSO), Bahía Blanca, Argentina. 2-Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) (CONICET-UNS), Bahía Blanca, Argentina. 3-Universidad Nacional del Sur (UNS), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Bahía Blanca, Argentina. [\\*bmpopovi@criba.edu.ar](mailto:bmpopovi@criba.edu.ar)



- Leonardi, PI; Popovich, CA; Damiani, MC, 2011. Feedstocks for second-generation biodiesel: microalgae's biology and oil composition. En: dos Santos Bernardes, MA (Ed.), *Economic effects of biofuel production*. In Tech Publisher, Croacia, pp. 318–346.
- Levitan, O; Dinamarca, J; Hochman, G; Falkowski, PG, 2014. Diatoms: a fossil fuel of the future, *Trends in Biotechnology* 32 (3):117-124.
- Martín, LA; Popovich, CA; Martínez, AM; Damiani, MC; Leonardi, PI, 2016. Oil assessment of *Halamphoracoffeaeformis* diatom growing in a hybrid two-stage system for biodiesel production. *Renewable Energy*, 92, 127-135.
- Montero, R; Hegel, P; Popovich, CA; Damiani, C; Pereda, S; Leonardi, PI, 2013. Fatty acids recovery from microalgae for biodiesel production. *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids*. Cartagena de Indias, Colombia.
- Popovich, CA, Guinder, V, Pettigrosso, R, 2008. Composition and dynamics of phytoplankton and aloricate ciliate communities from Bahía Blanca Estuary. Chapter 4. En: R. Neves, J. Baretta & M. Matteus (Eds), *Perspectives on integrated coastal zone management in South America*. IST Press, Scientific Publishers, Lisboa (Portugal), pp: 255-270.
- Popovich, CA; Damiani, C; Constenla, D; Leonardi, PI, 2012a. Lipid quality of the diatoms *Skeletonemacostatum* and *Naviculagregaria* from the South Atlantic Coast (Argentina): evaluation of its suitability as biodiesel feedstock. *Journal Applied Phycology*, 24, 1-10.
- Popovich, CA, Damiani, C, Constenla, D, Martínez, AM, Freije, R, Giovanardi, M, Pancaldi, S, Leonardi, PI, 2012b. Evaluation of growth and biochemical composition of *Nannochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 114:287-293.
- Rawat, I; Ranjith, R; Mutanda, T; Bux, F, 2013. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, 103: 444-467.
- Soto, G; Hegel, P; Popovich, C; Damiani, C; Pereda, S; Leonardi, PI, 2012. Biodiesel production from microalgae by supercritical methanolysis. *10th International Symposium on Supercritical Fluids*. San Francisco, USA.

1-Centro de Emprendedorismo y Desarrollo Territorial Sostenible (CEDETS)-(CIC-UPSO), Bahía Blanca, Argentina. 2-Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) (CONICET-UNS), Bahía Blanca, Argentina. 3-Universidad Nacional del Sur (UNS), Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Bahía Blanca, Argentina. [\\*bmpopovi@criba.edu.ar](mailto:bmpopovi@criba.edu.ar)