



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Energía Renovable

“Análisis del perfil de los ésteres metílicos obtenidos de dos microalgas verdes: *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella saccharophila*, y su variación en respuesta a condiciones de estrés”.

Tesis que presenta

PATRICIA YOLANDA CONTRERAS POOL

En opción al título de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida Yucatán Octubre del 2010

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en la Unidad de Biotecnología y la Unidad de Energía Renovable, en los laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida Yucatán a Octubre de 2010.

Patricia Yolanda Contreras Pool

Este trabajo se realizó en el laboratorio BTD04 de la Unidad de Biotecnología y en el laboratorio de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y el Dr. Luis Felipe Barahona Pérez.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 224389) otorgada para los estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY), por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, por su asesoría, tiempo y dedicación prestados para la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis Felipe Barahona Pérez, por su asesoría, tiempo y dedicación prestados para la realización de este trabajo.

A la Dra. Liliana María Alzate Gaviria y a la Dra. Sara Luz Nahuat Dzib por su contribución para la realización de este trabajo como miembros del comité tutorial.

Al Dr. Roger Orellana Lanza y Dr. Carlos Reyes Sosa por su contribución para la realización de este trabajo como revisores de la tesis.

A la Q.F.B Silvia López Adrián, por la donación de la cepa de *Chlorella saccharophila*.

A la Q.B.A Ileana Cecilia Borges Argáez, Q.I Tanit Toledano Thompson, y al M. en C. Jorge Arturo Domínguez Maldonado por el apoyo técnico prestado para la realización de este trabajo.

A mis compañeros amigos del laboratorio de la Unidad de Biotecnología del CICY (BTD04), que de alguna forma han contribuido a la realización de este trabajo e hicieron que el venir a trabajar fuese siempre agradable y divertido, Ileana C. Borges Argáez, Rodrigo A. Rivera Solís, Melissa L. Casais Molina, Laura A. Macario González, Anayeli Beltrán Aguilar, María Eugenia Duarte Coello, Shirley Bernardo Candelerero, Roberto A. Us Vázquez, Miguel Ángel Vallejo Reyna, Eduardo Castillo Castro y Fabio M. Idrovo Espín.

A mis compañeros amigos de la Maestría en Ciencias en Energía Renovable, por el apoyo durante estos dos años en los que hemos compartido esta experiencia, Elda I. España Gamboa, Ana R. Maciel Carmona, Angélica E. Herrera Lugo, Juana A. Erosa Solís, Andrés Guerrero Álvarez, Harvey D. Herrera Méndez, Frank A. Uicab Ballote, Pedro J. Poot Cauich, Diego X. González Quijano y Wiliam J. Pech Rodríguez.

Finalmente, pero no por ello menos importante a Dios, porque es él quien me da la fuerza para aceptar todas aquellas cosas que no puedo cambiar, el valor para cambiar todas aquellas cosas que puedo cambiar y la conciencia para distinguir las cosas que puedo cambiar de las que no puedo cambiar.

Dedicatorias

A todos y cada uno de los miembros de mi familia, pero de forma muy especial a mis padres Mario Florencio Contreras y Ligia Yolanda Pool Pech, y a mis hermanos Verónica Contreras Pool y Mario Contreras Pool, quienes en los momentos de alegría y gran emoción como el de ahora, siempre me acompañan, se alegran y emocionan junto conmigo, y que en los momentos de tristeza y profundo dolor fueron los cuatro pilares que sostuvieron mi vida...

Contenido

Resumen	xix
Abstract	xxi
Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes.....	3
1.1 Calentamiento global y combustibles fósiles	3
1.2 Energías renovables	4
1.2.1 Situación energética actual.	5
1.3 Biocombustibles.....	6
1.3.1 Etanol como biocombustible.....	7
1.3.2 Biogás	8
1.3.3 Biodiesel.....	8
1.3.3.2 Situación actual del biodiesel	10
1.3.3.3 Lípidos para biodiesel	12
1.3.3.4 Transesterificación.....	13
1.4 Cultivo de especies de microalgas verdes para la producción de biodiesel	15
1.4.1 Ventajas de las microalgas verdes sobre plantas superiores como materia prima para obtener biodiesel	17
1.4.2 Implementación de biorrefinerías a partir del cultivo de microalgas como materia prima para la obtención de biodiesel.....	18
1.5 Lípidos en microalgas verdes	20
1.5.1 Metabolismo de lípidos en microalgas verdes	20
1.5.2 Contenido de lípidos y triglicéridos en microalgas verdes	24
1.5.3 Composición de ácidos grasos en microalgas verdes	25
1.6 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	25
1.6.1 Características generales de <i>C. reinhardtii</i>	25
1.6.2 Lípidos encontrados en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	27

1.7 El género <i>Chlorella</i>	28
1.7.1 Características de <i>Chlorella saccharophila</i>	28
1.7.2 Lípidos encontrados en microalgas del género <i>Chlorella</i>	31
1.8 Justificación.....	32
1.9 Hipótesis	32
1.10 Objetivos	33
1.10.1 Objetivo general.....	33
1.10. 2 Objetivos específicos	33
Capítulo 2. Materiales y Métodos.....	34
2.1 Diseño experimental.....	34
2.1.1 Desarrollo experimental.....	36
2.2 Cepas y cultivo de microalgas	38
2.2.1 Medio de cultivo	39
2.2.1.1 Medio de cultivo con pH 9.5 (TAP pH 9.5) ó pH 10.5 (TAP pH 10.5)	39
2.2.1.2 Medio de cultivo con disminución de la fuente de Nitrógeno (TAP-[N]).....	40
2.2.2. Solución de NaCl	40
2.2.3 Cultivo de las microalgas	40
2.3 Determinación de la acumulación de biomasa	41
2.4 Extracción de lípidos	42
2.4.1 Transesterificación.....	42
2.4.2 Cromatografía de gases.....	43
2.4.3 Cromatografía de gases masas	43
2.4.4 Análisis estadístico	43
Capítulo 3 Análisis del perfil de ésteres metílicos en el cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> bajo condiciones de estrés por disminución de la fuente de nitrógeno, pH alcalino y estrés osmótico por NaCl.	44
3.1 Introducción.....	44
3.2 Materiales y métodos	45
3.2.1 Curva de crecimiento	45

3.2.2 Experimentos de estrés	45
3.2.3 Análisis de ésteres metílicos.....	48
3.3 Resultados y Discusión	49
3.3.1 Curva de Crecimiento	49
3.3.2. Identificación de ésteres metílicos por cromatografía de gases masas	50
3.3.3 Efecto del estrés por disminución de la fuente de nitrógeno, y la combinación con estrés osmótico por NaCl en el cultivo de <i>C. reinhardtii</i>	51
3.3.3.1. Efecto en la acumulación de biomasa.	51
3.3.3.2 Efecto en la acumulación de ésteres metílicos.	54
3.3.3.3 Comparación del efecto de los tratamientos de estrés en la obtención de ésteres metílicos totales.....	58
3.3.4 Efecto del estrés por pH 10.5, y la combinación con estrés osmótico por NaCl en el cultivo de <i>C. reinhardtii</i>	59
3.3.4.1. Efecto en la acumulación de biomasa.	59
3.3.4.2 Efecto en la acumulación de lípidos	61
3.3.4.3 Comparación del efecto de los tratamientos de estrés en la obtención de ésteres metílicos totales.....	65
3.4 Conclusiones	67
4.1 Introducción.....	68
4.2 Materiales y métodos	69
4.2.1 Determinación del medio de cultivo.....	69
4.2.2 Curva de crecimiento	69
4.2.3 Experimentos de estrés	69
4.2.4 Análisis de ésteres metílicos.	72
4.3 Resultados y Discusión	73
4.3.1 Determinación del mejor medio de cultivo.....	73
4.3.2 Curva de crecimiento	78
4.3.3. Identificación de ésteres metílicos por cromatografía de gases masas	79

4.3.4 Efecto del estrés por disminución de la fuente de nitrógeno y la combinación con estrés osmótico por NaCl en el cultivo de <i>C. saccharophila</i>	80
4.3.4.1 Efecto en la acumulación de biomasa	80
4.3.4.2 Efecto en la acumulación de ésteres metílicos	83
4.3.4.3 Comparación del efecto de los tratamientos de estrés en la producción de ésteres metílicos totales.....	86
4.3.5 Efecto del estrés por pH 9.5, y la combinación con estrés osmótico por en el cultivo de <i>C. saccharophila</i>	88
4.3.5.1. Efecto en la acumulación de biomasa	88
4.3.5.2 Efecto en la acumulación de lípidos.	90
4.3.5.3 Comparación del efecto de los tratamientos de estrés en la producción de ésteres metílicos totales.....	94
4.3.6 Efecto del estrés por pH 10.5, y la combinación con estrés osmótico por en el cultivo de <i>C. saccharophila</i>	95
4.3.6.1 Efecto en la acumulación de biomasa	95
4.3.6.2 Efecto en la acumulación de lípidos.	97
4.3.6.3 Comparación del efecto de los tratamientos de estrés en la producción de ésteres metílicos totales.....	100
4.4 Conclusiones.....	102
Discusión general	103
Conclusiones y Perspectivas	105

Índice de tablas

Tabla 1.1. Comparación de algunas fuentes de biodiesel [25]	12
Tabla 1.2. Ejemplos de ácidos grasos	13
Tabla 1.3 Contenido de aceites de algunas microalgas [3].	16
Tabla 1.4. Composición química de algunas microalgas en base al peso seco (%) [35]. .	19
Tabla 1.5. Composición de los lípidos (% molar) en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> [53]......	28
Tabla 1.6. Composición de ácidos grasos del total de lípidos de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (los ácidos grasos son designados por el número de carbonos: número de dobles enlaces) [53]......	28
Tabla 1.7. Ácidos grasos encontrados en <i>Chlorella vulgaris</i> [59].	31
Tabla 3.1. Variación de ésteres metílicos obtenidos de <i>C. reinhardtii</i> en respuesta a estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos.....	56
Tabla 3.2 Variación de ésteres metílicos obtenidos de <i>C. reinhardtii</i> en respuesta a estrés por pH alcalino 10.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos.....	63
Tabla 4.1. Variación de ésteres metílicos obtenidos de <i>C. saccharophila</i> en respuesta a estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos.....	84
Tabla 4.2. Variación de ésteres metílicos obtenidos de <i>C. sacharophila</i> en respuesta a estrés por pH alcalino 9.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos.....	92

Tabla 4.3. Variación de ésteres metílicos obtenidos de *C. saccharophila* en respuesta a estrés por pH alcalino 10.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos..... 98

Índice de figuras

Figura 1.1. Reacción de transesterificación [3].....	10
Figura 1.2. Estructura básica de los triglicéridos. Los radicales (R1, R2, y R3) consisten de una cadena de carbonos de longitud y saturación variable [28].	13
Figura 1.3. Reacción de transesterificación. A) Formación de metóxido sódico, B) Ionización de metóxido sódico, C) Formación del ion diglicérido y un éster metílico, D) Formación de un diglicérido y un alcóxido [29].....	15
Figura 1.4. Esquema de producción de biodiesel a partir de microalgas [33]......	19
Figura 1. 5. Ruta de síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto [6].	22
Figura 1.6. Esquema simplificado de la vía de biosíntesis de triglicéridos en algas. (1) Citosol glicerol-3-fosfato acyl transferasa, (2) lyso ácido fosfatídico acyl transferasa, (3) ácido fosfatídico fosfatasa y (4) diglicerol acyl transferasa [19].....	23
Figura 1.7. Estructura celular de la microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> [52].	27
Figura 1.8. Estructura celular de la microalga del género <i>Chlorella</i> [54]......	29
Figura 2.1. Diseño experimental.	34
Figura 2.2. Desarrollo experimental.	38
Figura 2.3. Cultivos de las microalgas	40
Figura 2.4. Vista desde el microscopio de la cámara de Neubauer. A) Vista desde objetivo 10X, B) Vista de los 5 cuadros en el que se cuentan células desde objetivo 10X, C) vista del cuadro del centro desde objetivo 40X.	42

Figura 3.1. Diseño del experimento 1. Análisis del perfil de ésteres metílicos bajo estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos.	47
Figura 3.2. Diseño del experimento 2. Análisis del perfil de ésteres metílicos bajo estrés por pH alcalino 10.5, estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos.	48
Figura 3.3. Curva de crecimiento de <i>C. reinhardtii</i>	49
Figura 3.4. Cultivos de <i>C. reinhardtii</i> , en matraces con 50 mL de TAP, y células de estos cultivos observadas al microscopio óptico a 40X al final del experimento (día 15), con los diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno.....	52
Figura 3.5. Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).....	53
Figura 3.6. Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)....	55
Figura 3.7. Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de	

ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)... 57

Figura 3.8 Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3). 59

Figura 3.9. Cultivos de *C. reinhardtii*, en matraces con 50 mL de TAP, y células de estos cultivos observadas al microscopio óptico a 40X al final del experimento (día 10), con los diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. 60

Figura 3.10. Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3). 61

Figura 3.11. Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3). 62

Figura 3.12. Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)..... 65

Figura 3.13. Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino (10.5). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3)..... 66

Figura 4.1. Diseño del experimento 1. Análisis del perfil de ésteres metílicos bajo estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de estos tratamientos (3 cultivos por tratamiento)..... 71

Figura 4.2. Diseño de los experimentos 2 y 3. Análisis del perfil de ésteres metílicos bajo estrés por pH alcalino (9.5 ó 10.5), por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de estos tratamientos (3 cultivos por tratamiento)..... 72

Figura 4.3. Inicio de evaluación de cuatro medios de cultivo. TAP = medio Tris-Acetato-Fosfato, BB = medio Bold Basal, FITZ = medio Fitzgerald y BG11 = medio BG11..... 74

Figura 4.4. Curvas de crecimiento de *Chlorella saccharophila* en diferentes medios de cultivo, sin ácido acético para los medios de cultivo; FITZ, BB y BG11..... 74

Figura 4.5. Cultivos de *C. saccharophila* en líquido e imágenes de microscopía óptica a 40X de las células en los 4 medios evaluados (todos con ácido acético). A) al día 5 de cultivo, B) al día 11 de cultivo, C) al día 17 de cultivo y C) al día 23 de cultivo..... 76

Figura 4.6. Curvas de crecimiento en diferentes medios de cultivo (adicionados con ácido acético)..... 77

Figura 4.7. Curva de crecimiento *C. saccharophila*..... 78

Figura 4.8. Cultivos de *C. reinhardtii*, en matraces con 50 mL de TAP, y células de estos cultivos observadas al microscopio óptico a 40X al final del experimento (día 18), con los diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno..... 81

Figura 4.9. Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma grafica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)..... 82

Figura 4.10. Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)... 84

Figura 4.11. Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)... 86

Figura 4.12 Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3). 87

Figura 4.13. Cultivos de *C. reinhardtii*, en matraces con 50 mL de TAP, y células de estos cultivos observadas al microscopio óptico a 40X al final del experimento (día 13), con los diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino..... 88

Figura 4.14. Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza n = 3). 89

Figura 4.15. Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)..... 91

Figura 4.16. Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3). 93

Figura 4.17. Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino (10.5). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3)..... 94

Figura 4.18. Cultivos de *C. saccharophilai*, en matraces con 50 mL de TAP, y células de estos cultivos observadas al microscopio óptico a 40X al final del experimento (día 13), con los diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. 95

Figura 4.19. Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma grafica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3). 97

Figura 4.20. Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias ignificativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)..... 98

Figura 4. 21. Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras

minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)..... 100

Figura 4. 22. Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino (10.5). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3)..... 101

Resumen

El biodiesel es un combustible que se obtiene de aceites vegetales o grasas animales mediante el proceso químico de transesterificación y que puede ser utilizado como sustituto total o parcial del gasóleo en motores de diesel convencionales. La utilización de aceites de cultivos de oleaginosos como materia prima para la producción de biodiesel requiere de grandes extensiones de tierra para cultivo, grandes cantidades de agua para riego y está sujeta a las condiciones estacionales climáticas, así como riesgos de plagas y enfermedades, lo que puede poner en peligro su producción. Ante estos inconvenientes, se ha sugerido a las microalgas, o algas unicelulares, como una alternativa para la producción de biodiesel, ya que son microorganismos con el potencial de acumular grandes cantidades de biomasa, sobre todo lípidos, en un corto tiempo y a un costo relativamente bajo. Sin embargo, existen aspectos del cultivo y de la cepa a utilizar que hay que contemplar para que este potencial sea una realidad. Entre estos aspectos, un factor importante es la optimización de las condiciones de cultivo, debido a que si son las adecuadas, podrían mejorar la producción de lípidos. Por otro lado, es necesario evaluar el potencial de producción de lípidos de cepas de microalgas distintas a las ya reportadas en la literatura.

En este trabajo se evaluó el perfil de ésteres metílicos de dos especies de microalgas verdes de agua dulce, en respuesta a condiciones de estrés por disminución de la fuente de nitrógeno, estrés por pH alcalino, y estrés osmótico por NaCl. Para la realización del estudio se utilizaron dos especies de microalgas: *Chlamydomonas reinhardtii*, la cual ha sido utilizada por más de 60 años como modelo de estudio en investigación científica, y *Chlorella saccharophila*, una especie nativa del Estado de Yucatán. Los resultados mostraron que con el cultivo de ambas especies de microalgas se obtiene un perfil adecuado de triglicéridos para la producción de biodiesel. El tratamiento de estrés por disminución de la fuente de nitrógeno produjo una mayor cantidad de ésteres metílicos (15 y 25.10% con base en la biomasa seca, para *C. reinhardtii* y *C. saccharophila* respectivamente) así como una mejor calidad (16 y 18 carbonos) de estos compuestos. En este trabajo se confirmó el potencial de *C. reinhardtii* como organismo modelo para el estudio del metabolismo de lípidos. Sin embargo, su capacidad de acumular biomasa y lípidos fue tres veces menor a la presentada por *C. saccharophila*. Por otra parte, si el propósito fuera la producción de biodiesel a corto plazo, este estudio demostró que la

especie *C. saccharophila* tiene un gran potencial como fuente de materia prima para la producción de este biocombustible. Lo anterior debido a su capacidad de acumular grandes cantidades de biomasa, lípidos, y al adecuado perfil de ésteres metílicos obtenido a partir de su cultivo.

Abstract

Biodiesel is obtained from vegetable oils or animal fats by transesterification and can be used as a diesel substitute in conventional diesel engines. The use of seed oils as feedstock for biodiesel production requires large land areas for cultivation, large amounts of water for irrigation, and it is subjected to climate conditions, pests and diseases. Microalgae have been suggested as the best alternative for the production of biodiesel, as they have the potential to accumulate large amounts of biomass and lipids in a short time and in a cost-effective manner. However, some aspects like culture conditions and selection of strains have to be investigated for this potential to become a reality. In regard to culture conditions, they have to be optimized to improve the accumulation of lipids. It is also necessary to evaluate the potential of other microalgae strains besides those already reported in the literature. In this study, we evaluated the fatty acid methyl ester (FAME) profile from two species of fresh water green microalgae under stress conditions: low nitrogen, alkaline pH and osmotic stress. For this purpose we used *Chlamydomonas reinhardtii*, which has been used as a model organism in scientific research for over 60 years, and *Chlorella saccharophila* which is an indigenous strain from Yucatán (Mexico). The results showed that both microalgae species have an adequate profile of triglycerides for biodiesel production. The low nitrogen stress treatment produced the greater amount of FAME (15 and 25.10% dry biomass weight for *C. reinhardtii* and *C. saccharophila* respectively) as well as a good quality of methyl esters for each species of microalga. Although *C. reinhardtii* showed the right profile of methyl esters, its ability to accumulate biomass and lipids was three times less than the one showed for *C. saccharophila*. For the production of biodiesel in the short term, *C. saccharophila* has a great potential, because of its ability to accumulate large amounts of biomass and lipids, besides its methyl ester profile.

Introducción

Actualmente el mundo se enfrenta a la amenaza de una crisis energética debido al declive en la disponibilidad del petróleo. Por otro lado, el desarrollo tecnológico y económico que se ha basado en el uso de combustibles fósiles, ha originado un deterioro importante del ambiente, ya que el uso de estos combustibles no renovables provocan efectos negativos que pueden ser de gran magnitud como el calentamiento global, el cual es provocado por las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), contaminantes que se originan cuando los combustibles fósiles son quemados. Ante este panorama, surge la necesidad de disminuir la dependencia de las fuentes convencionales de energía y, de una manera más apremiante, reducir las emisiones de CO₂ y otras sustancias contaminantes. Lo anterior ha estimulado en muchos países el desarrollo de normatividades ambientales más estrictas y la investigación en nuevas formas de obtener energía de manera más limpia, eficiente y de modo sustentable. Para estar acorde con las nuevas reglamentaciones y como una manera de hacer más competitivos sus procesos y productos, muchas empresas han comenzado a incorporar e investigar fuentes renovables de energía, y el uso de biocombustibles está siendo promocionado por gobiernos, empresas, organizaciones internacionales y hasta por organizaciones no gubernamentales [1].

Hoy en día y ante este panorama, el biodiesel surge como una alternativa muy atractiva, ya que es un biocombustible derivado de aceites vegetales o grasas animales que puede ser utilizado como sustituto total o parcial del gasóleo en motores de diesel convencionales [2]. El biodiesel puede ser obtenido de grasas animales, tales como cebo de búfalo, vaca o cerdo, o de aceites vegetales provenientes de las semillas de girasol, palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.), coco (*Cocos nucifera* Linneo), *Brassica carinata* A. Braun, *Camelia sativa* (L). Crantz, *Jatropha curcas* Linneo, soya (*Glicine max* (L) Merr.), etc. Uno de los principales inconvenientes de utilizar aceites vegetales como los mencionados, es la necesidad de grandes extensiones de tierra para el monocultivo de las plantas de las que se extraen. Cabe resaltar que el uso de tierras destinadas a cultivos agrícolas para la alimentación ocasionaría problemas sociales. Otro inconveniente es que algunos cultivos necesitan de grandes cantidades de agua para su riego, y están sujetos a la ocurrencia de fenómenos meteorológicos (por ejemplo huracanes) que en un momento

dado pueden poner en riesgo la producción de biodiesel. De igual forma, las plagas y enfermedades pueden llegar a ser una amenaza importante para los cultivos. Ante este panorama, diversos estudios han sugerido a las microalgas como la mejor alternativa para la producción de biodiesel, ya que son microorganismos con el potencial de acumular grandes cantidades de biomasa y lípidos en un corto tiempo y de manera costeable [3]. Sin embargo, esto no quiere decir que las microalgas sean la única alternativa, sino que es una materia prima alternativa que conjuntamente a los aceites provenientes de cultivos oleaginosos ayudaría a satisfacer la demanda de aceites para la producción de biodiesel, contribuyendo a mitigar los daños causados al medio ambiente.

En este trabajo se describe la evaluación del perfil de ésteres metílicos de las microalgas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Dang y *Chlorella saccharophila* (Krüger) Migula, en respuesta a condiciones de estrés. Estos resultados nos permitieron identificar el potencial de estas microalgas como fuente de materia para la obtención de biodiesel.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 Calentamiento global y combustibles fósiles

Durante las últimas décadas, el planeta ha experimentado muchos cambios ambientales, se sabe que el planeta ha sufrido más cambios ambientales en los últimos 200 años que en los últimos 2000, y más en los últimos 20 años que en los últimos 200 [8]. Un ejemplo muy preocupante de estos cambios climáticos es el acelerado proceso de calentamiento global que el planeta ha venido experimentando. El exceso de dióxido de carbono (CO_2) en la atmósfera produce una capa traslúcida, parecida a un invernadero que permite que la radiación solar entre al planeta, pero que no pueda salir durante la noche, a esto se le conoce como efecto invernadero, el cual es causante del calentamiento global [1]. La temperatura media de la atmósfera terrestre y de los océanos se ha elevado desde finales del siglo XIX debido a la actividad humana relacionada con la industrialización, principalmente por la quema de combustibles a base de petróleo, gas y carbón. El grupo intergubernamental de expertos sobre cambio climático (IPCC) ha calculado que las temperaturas podrían aumentar entre 1.5 a 5.8 °C para finales de este siglo, ya que se estima un aumento de entre 25% y 90% de las emisiones mundiales de los gases de efecto invernadero entre los años 2000 y 2030, como respuesta al incremento de las actividades humanas en relación con la industrialización [9].

Los impactos del calentamiento global pueden llegar a ser graves y son cada vez más evidentes, y entre ellos se incluyen sequías en unas zonas, inundaciones en otras, casquetes polares que se derriten, al igual que los glaciares (fuentes importantes de agua dulce). Se predice una extinción masiva de especies relacionada con el cambio climático, por ejemplo de anfibios y de arrecifes de coral. Se prevén impactos en la agricultura muy graves, así como la emergencia de enfermedades relacionadas con el cambio del clima como malaria, dengue y otras [8].

Ante los problemas mencionados y con el fin de mitigar los daños causados al medio ambiente, el 11 de diciembre de 1997, algunos países industrializados se comprometieron en Japón, a ejecutar un conjunto de medidas para reducir los gases de efecto

invernadero, mediante el acuerdo internacional denominado Protocolo de Kyoto sobre el Cambio Climático. Este protocolo tiene por objetivo que los países firmantes se comprometan a reducir las emisiones de gases responsables del calentamiento global, como son: CO₂, CH₄, NO_x, además de tres gases artificiales industriales fluorados: hidrofluorocarbonos (HFC), perfluorocarbonos (PFC), y hexafluoruro de azufre (SF₆), en un porcentaje de un 5% a nivel mundial, dentro del periodo que va desde el año 2008 al 2012, en comparación a las emisiones al año de 1990 [6].

1.2 Energías renovables

Las energías renovables, conocidas como energías alternativas o limpias representan actualmente el 20% del consumo energético mundial [11]. Las energías renovables se clasifican según la fuente natural de la que proceden en:

Energía solar.- Se basa en el aprovechamiento de la radiación solar que llega a la superficie terrestre y que posteriormente es transformada en electricidad o calor.

Energía eólica.- Es la que se produce a través de la energía cinética del viento transformándola en electricidad, todo ello mediante los denominados aerogeneradores cuya agrupación conforma las centrales eólicas.

Energía hidráulica.- Aprovecha la energía generada por las diferencias de nivel de los cursos de agua para transformarla en energía eléctrica. Este tipo de energía se considera renovable cuando su aprovechamiento se realiza con una potencia de hasta 10 MW. La energía hidráulica que supera esta potencia no se considera renovable debido al gran impacto ambiental que causa su emplazamiento.

Energía de la biomasa.- Es la que se obtiene a través de la materia orgánica renovable de origen vegetal o animal o de microorganismos, procedente de procesos de transformación natural o artificial.

Geotérmica.- Aunque no se considera una energía renovable en sí, es una energía procedente del calor interior de la tierra, que se puede aprovechar en la generación de electricidad ó en procesos térmicos.

Las energías renovables presentan muchas ventajas entre las que se encuentran: son limpias, ya que no generan residuos de difícil eliminación; su impacto ambiental es reducido, debido a que producen pocas emisiones de CO₂ y otros gases contaminantes a la atmósfera como los óxidos de azufre (SOx) y nitrógeno (NOx), impulsan las economías locales con la creación de hasta cinco veces más puestos de trabajo que las energías convencionales y son una alternativa viable a las energías convencionales [12]

Las energías renovables también pueden tener ciertos impactos negativos, pero éstos no son comparables a los generados por las energías derivadas del petróleo [13], por lo que muchos países invierten y apoyan fuertemente la investigación en las energías renovables para que su implementación crezca en un futuro cercano. En este sentido, se busca eliminar los impactos negativos, reducir su carácter cíclico por medio de la construcción de sistemas híbridos basados en combinaciones de varias de estas fuentes (energía solar, eólica, biocombustibles, celdas de combustibles). Otro problema para resolver es el almacenamiento de la energía generada, para ello se han propuesto como alternativas el uso de hidrógeno como vector energético [14] o bien, el uso de alcoholes producidos a partir de la biomasa.

1.2.1 Situación energética actual.

La amenaza de una crisis energética a la que hoy en día se enfrenta el mundo, se debe a la dependencia de combustibles de origen fósil, y genera preocupaciones serias debido al declive en la disponibilidad del petróleo. El Instituto Americano del Petróleo ha estimado que el abasto del crudo, se agotará en algún momento del siglo XXI. Aunque nuevos pozos todavía serán encontrados, el costo de recuperación será cada vez más alto [15], por lo que surge la necesidad de contar con energías alternas que sean capaces de cubrir la demanda energética, además de ser ecológicamente sostenibles, para mitigar los

daños causados al ambiente por el uso de combustibles fósiles (petróleo y carbón) durante muchos años.

Debido a que en México hoy en día 90% de la energía que se consume proviene de fuentes no renovables [16] y con el propósito de reducir los impactos ambientales que se generan en el país, así como para impulsar tecnologías limpias que nos liberen de la dependencia hacia la utilización de los hidrocarburos como fuente primaria de energía, en el año 2008 se estableció la Ley para el Aprovechamiento de Energías Renovables y el Financiamiento de la Transición Energética, así como la Ley de Promoción y Desarrollo de Bioenergéticos. En esta ley los bioenergéticos, combustibles obtenidos de la biomasa, son presentados como una alternativa sustentable. [17].

1.3 Biocombustibles

Los biocombustibles son portadores de energía derivada de la biomasa. Se puede utilizar una amplia gama de fuentes de biomasa, como por ejemplo: la biomasa proveniente de la materia orgánica de las actividades agrícola, pecuaria, acuicultura, fiococultura, residuos de la pesca, residuos domésticos, comerciales, industriales, de microorganismos y de enzimas [18], para producir bioenergía en diversas formas, desde la quema de palos y ramas para cocinar, la fermentación de residuos para la obtención de biogás, hasta la realización de cultivos con el fin de obtener a partir de ellos biocombustibles líquidos, como el bioetanol y el biodiesel.

Los biocombustibles se clasifican según su estado físico en sólidos, como la leña, el carbón vegetal y fósil, así como la madera; líquidos, como el etanol y el biodiesel; o gaseosos, como el biogás. De igual forma se puede hacer una distinción elemental entre biocombustibles primarios (sin elaborar) y secundarios (elaborados) [19].

Los Biocombustibles primarios, como la leña y la madera son aquellos en los que el material orgánico se usa esencialmente en su forma natural (tal como son colectados). Este tipo de biocombustible es de combustión directa y en general se usa para satisfacer la demanda de calor para cocinar, generar calefacción o electricidad en aplicaciones industriales a pequeña escala. Los biocombustibles secundarios en forma sólida como el

carbón vegetal, en forma líquida como el etanol y el biodiesel, o en forma gaseosa como el biogás o biohidrógeno, pueden usarse en un número mayor de aplicaciones, como el transporte y procesos industriales a altas temperaturas [19].

Los biocombustibles líquidos producidos actualmente a partir de cultivos ricos en azúcar o almidón (en el caso del etanol) y cultivos de semillas oleaginosas (en el caso del biodiesel) generalmente se denominan biocombustibles de primera generación. Una segunda generación de tecnologías en fase de desarrollo podría permitir utilizar, además, biomasa lignocelulósica [15].

1.3.1 Etanol como biocombustible

El etanol (C_2H_5OH), también conocido como alcohol etílico o de grano, es un líquido inflamable, incoloro y es el alcohol de menor toxicidad; se obtiene a partir de tres tipos de materia prima: los productos ricos en sacarosa como la caña de azúcar, la melaza y el sorgo dulce; las fuentes ricas en almidón como cereales (maíz, trigo, cebada, etc.) y tubérculos (yuca, camote, papa); y mediante la hidrólisis de los materiales ricos en celulosa como la madera y los residuos agrícolas [15]

El etanol puede mezclarse con gasolina o quemarse puro en motores de encendido por chispa ligeramente modificados. Un litro de etanol contiene aproximadamente el 66 por ciento de la energía suministrada por un litro de gasolina, pero posee un nivel más elevado de octano y, mezclado con gasolina para el transporte, mejora el rendimiento de esta última, disminuye además el consumo de combustible de origen fósil de los vehículos, con lo que se reduce la emisión de monóxido de carbono. No obstante, la combustión del etanol también provoca una reacción más fuerte con el nitrógeno de la atmósfera, lo que puede resultar en un aumento marginal de los gases de óxido de nitrógeno [19], gases de efecto invernadero.

Con el propósito de hacer del etanol un biocombustible competitivo con el petróleo se ha considerado el uso de materia prima menos costosa como la lignocelulosa, pero la utilización de esta materia prima no es viable en la actualidad, ya que aún no se cuenta

con la tecnología adecuada para tratar el material lignocelulósico [15], y las tecnologías maduras para la producción de etanol se basan en cosechas de cultivos agrícolas como se mencionó anteriormente.

1.3.2 Biogás

El biogás es una mezcla de gases compuesta de 60-70% de metano (CH_4) y el resto de dióxido de carbono (CO_2), pequeñas porciones de nitrógeno (N_2), sulfuro de hidrógeno (SH_2) e hidrógeno (H_2) [20]. En la naturaleza se encuentra una gran variedad de materia orgánica a partir de la cual puede producirse biogás: los cultivos energéticos, los desechos provenientes de animales domésticos como vacas, cerdos y aves, residuos vegetales como pajas, pastos u hojas secas, así como basura doméstica [21].

Una de las ventajas del biogás es que puede sustituir al gas natural y por lo tanto utilizarse en las redes de distribución ya existentes. Puede usarse en las turbinas de gas para producir electricidad o como combustible para el transporte, después de un proceso de purificación.

La producción de biogás es posible en aquellos países que poseen una gran cantidad de materia orgánica y se está desarrollando a gran velocidad en países como la Unión Europea, China, India y Brasil, para obtener energía de fuentes renovables en forma económica [21]. La principal desventaja del biogás es su costo, el cual es más elevado que el de los combustibles convencionales.

1.3.3 Biodiesel

El biodiesel es un biocombustible derivado de aceites vegetales o grasas animales que puede ser utilizado como sustituto total o parcial del gasóleo en motores diesel convencionales [2].

La utilización de combustibles vegetales, en motores diesel, es casi tan antigua como el mismo motor. En 1900, Rudolf Diesel, el inventor del motor que lleva su nombre, demostró en la Exposición Mundial de París, el funcionamiento del motor de encendido por compresión usando como combustible aceite de cacahuete [22]. En 1912, Rudolf

Diesel dijo que “la utilización de aceites vegetales como combustible para los motores puede parecer insignificante hoy, pero estos aceites pueden llegar a ser tan importantes como el petróleo en el futuro”.

Los aceites vegetales fueron utilizados en motores diesel desde 1920, pero en ese mismo año, los fabricantes de motor diesel cambiaron sus motores para utilizar petrodiesel cuya viscosidad es inferior a la del aceite de vegetal, ya que la vida útil de los motores se veía afectada [1].

El término biodiesel fue adoptado para describir al aceite transesterificado utilizado como un combustible diesel. Uno de los primeros empleos de aceite vegetal transesterificado fue antes de la Segunda Guerra Mundial para impulsar vehículos pesados en Sudáfrica. Durante la Segunda Guerra Mundial y ante la escasez de combustibles fósiles, se hicieron algunas investigaciones en Brasil para obtener diesel de origen vegetal, pero fue en 1970 que el biodiesel se desarrolló de forma significativa a raíz de la crisis energética que acaecía en ese momento y al elevado costo del petróleo [1].

Las primeras pruebas técnicas con biodiesel se llevaron a cabo en 1982 en Austria y Alemania, pero fue en 1985 en Silberberg, Austria, en el que se construyó la primera planta piloto productora de RME (Rapeseed Methyl Ester por sus siglas en Inglés, o biodiesel a partir de aceite de colza) [1].

Las propiedades del biodiesel en gran parte son determinadas por la estructura de los ésteres de ácidos grasos del que proviene. Las características más importantes incluyen la calidad de ignición (por ejemplo el número de cetanos), propiedades de flujo en frío y la estabilidad oxidativa. Mientras que el perfil de los ácidos grasos no parecen tener un mayor impacto en la producción de biodiesel por el proceso de transesterificación, realmente afectan las propiedades del biodiesel. Por ejemplo, las grasas saturadas producen un biodiesel con una estabilidad oxidativa superior y un número de cetano más alto, pero propiedades bastante pobres a bajas temperaturas. El biodiesel producido con ácidos grasos poliinsaturados, tiene buenas propiedades de flujo en frío. Sin embargo, estos ácidos grasos son en particular susceptibles a la oxidación, por lo tanto, el biodiesel producido de materias primas enriquecidas por esta especie de ácidos grasos tiende a tener problemas de inestabilidad durante el almacenaje prolongado [6]. Por lo tanto lípidos

ricos en ácidos grasos C 16:1, C18:1, C18:2 y C18:3 son considerados los mejores para la producción de biodiesel, ya que son bastante estables desde el punto de vista químico.

1.3.3.2 Situación actual del biodiesel

El biodiesel es un biocombustible que ha atraído cada vez más la atención en el mercado automotriz, ya que puede reducir drásticamente las emisiones de monóxido de carbono, partículas de materia, la densidad del humo, así como la emisión de SO_x y compuestos aromáticos, causadas por los hidrocarburos [23].

La forma de obtenerlo es mediante el proceso químico de transesterificación, también llamado alcoholísis, que es la reacción de una grasa, triglicérido o un aceite con un alcohol para formar ésteres y glicerol [24] (Figura 1.1). El biodiesel puede ser obtenido de grasas animales, tales como sebo de búfalo, vaca o cerdo, o de aceites vegetales provenientes de las semillas de girasol, palma aceitera, cocotero, soya, *Brassica carinat*, *Camelia sativa*, *Jatropha curcas*, entre otras.

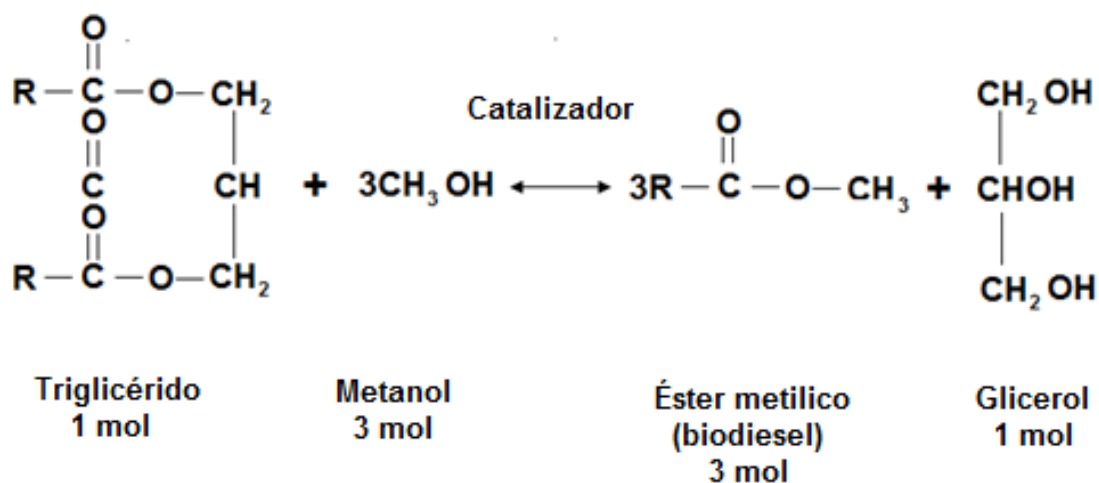


Figura 1.1. Reacción de transesterificación [3].

La utilización de los aceites vegetales provenientes de las fuentes antes mencionadas, puede presentar ciertas desventajas, como se enumeran a continuación:

1. Los terrenos que deberían ser destinadas al cultivo de alimentos, sobre todo en países como México en el que la mayoría de los alimentos son importados, se estarían destinando ahora a la producción de biocombustibles, esto podría provocar una carestía de alimentos.
2. Este tipo de cultivos vegetales son perennes y por lo tanto tardan varios años en dar los frutos y semillas de en el que se extraen los aceites.
3. Se necesitan grandes cantidades de agua para riego.
4. Se está supeditado a condiciones ambientales no controlables, como huracanes, sequías, inundaciones, plagas, etc. que pueden poner en riesgo la producción.
5. Además, de acuerdo con Schenk *et al.* [25] si se pretendiera sustituir la demanda mundial de petróleo por biodiesel se necesitarían 4.875×10^{12} L anualmente. La producción de aceites vegetales necesitaría de áreas exageradamente grandes, desde 819×10^6 ha hasta 15002×10^6 ha, para cubrir esta demanda.

El panorama anterior cambia drásticamente, al menos en teoría, si se utilizan microalgas o algas unicelulares que pueden acumular grandes contenidos de lípidos para la producción de biodiesel [26]. Por ejemplo, para cubrir la demanda mundial anual de petróleo con base en el cultivo de microalgas se considera que sólo se necesitaría entre 20.5% y el 2.5% del área cultivable mundial [25], como se muestra en la Tabla 1.1, y es por ello que actualmente muchas investigaciones están dirigidas al uso de los lípidos de microalgas para la producción de biodiesel.

Tabla 1.1. Comparación de algunas fuentes de biodiesel [25]

Cultivo	Biodiesel (L/ha·año)	Superficie de tierra necesaria para producir la demanda mundial de petróleo (M ha).	Área requerida como % de la tierra mundial	Área requerida como % de la tierra cultivable mundial
Algodón	325	15,002	100.7	756.9
Soya	446	10,932	73.4	551.6
Grano de mostaza	572	8,524	57.2	430.1
Girasol	952	5,121	34.4	258.4
Canola	1,190	4,097	27.5	206.7
Jatropha	1,892	2,557	17.3	130 (0 ^a)
Palma aceitera	5,950	819	5.5	41.3
Microalgas(10 gm ⁻² día ⁻¹ con 30% TAG)	12,000	406	2.7	20.5 (0 ^a)
Microalgas(10 gm ⁻² día ⁻¹ con 50% TAG)	98,500	49	0.3	2.5 (0 ^a)

^a Si los estanques y biorreactores de microalgas se encuentran en la tierra no cultivable; Jatropha es principalmente cultivado en tierras marginales.

1.3.3.3 Lípidos para biodiesel

Como ya se mencionó anteriormente, la producción de biodiesel tiende a provenir mayoritariamente de los aceites extraídos de plantas oleaginosas, especialmente girasol, soja y colza. Sin embargo, cualquier materia que contenga triglicéridos (TAG) puede utilizarse para la producción de biodiesel [3, 24]. Los triglicéridos se encuentran en forma abundante en los granos de cereales, semillas oleaginosas y grasas de origen animal [27]. La estructura básica de los triglicéridos (Figura 1.2) consiste de una unidad de glicerol (un azúcar de tres oxidrilos) y tres unidades de ácidos grasos, los cuales pueden ser saturados o no saturados (Tabla 1.2) [28] la unión entre los ácidos grasos y los oxidrilos está en forma de éster.

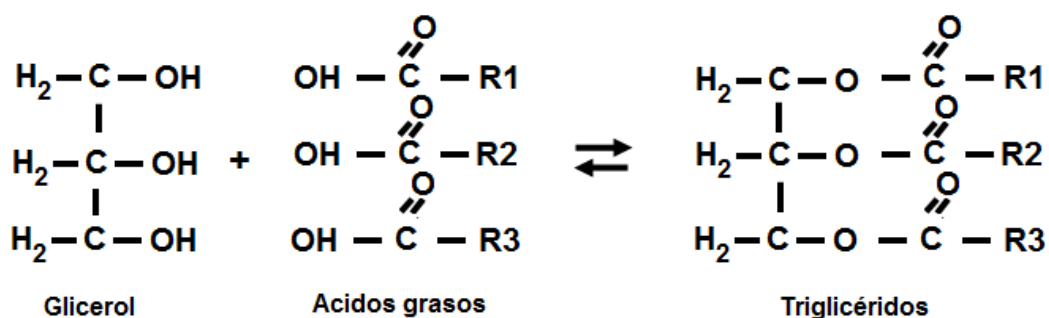


Figura 1.2. Estructura básica de los triglicéridos. Los radicales (R1, R2, y R3) consisten de una cadena de carbonos de longitud y saturación variable [28].

Tabla 1.2. Ejemplos de ácidos grasos

Ácidos grasos	Nombre Común	Estructura	Abreviatura
Saturados	Mirístico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$	(C14:0)
	Palmítico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$	(C16:0)
	Esteárico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$	(C18:0)
No Saturados	Palmitoléico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	(C16:1)
	Oléico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	(C18:1)
	Linoléico	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	(C18:2)
	Linolénico	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	(C18:3)

1.3.3.4 Transesterificación

La transesterificación (también llamada alcoholisis) es uno de los métodos más comúnmente usados para producir biodiesel, en el que los triglicéridos reaccionan con un alcohol por ejemplo metanol, dando lugar a la producción de ésteres de metilo de los ácidos grasos, y glicerol. El nombre de reacción de transesterificación se debe a que se pasa del éster triglicerol al éster metílico o ésteres de alquilo (dependiendo del alcohol utilizado) al concluir la reacción.

La transesterificación puede ser catalizada por catalizadores ácidos como H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4 , catalizadores alcalinos como KOH , NaOH o por biocatalizadores como las enzimas lipasas. La reacción con catalizadores alcalinos es 4,000 veces más rápida que la reacción con catalizadores ácidos. Por consiguiente, las bases como el hidróxido de sodio y de potasio son comúnmente usados como catalizadores comerciales. Los alcóxidos como metóxido de sodio son aún mejores catalizadores que el de potasio y cada vez están siendo más usados. El único problema de estos catalizadores es que deben ser anhidros para evitar que se produzcan reacciones secundarias, como la de saponificación, que reducirían el rendimiento del proceso. Por otra parte, los triglicéridos deben tener una baja proporción de ácidos grasos libres para evitar que se neutralicen con el catalizador y también se formen jabones. El empleo de lipasas no es comúnmente utilizado debido al alto costo del catalizador [3].

La reacción de transesterificación ocurre gradualmente, primero los triglicéridos son convertidos a diglicéridos, posteriormente a monoglicéridos y finalmente a glicerol [3]. Para poder realizar la reacción de transesterificación por medio de catalizadores básicos, antes es necesaria la formación de metóxido sódico o potásico producido por una mezcla de metanol e hidróxido sódico o potásico (Figura 1.3 A), ya que cuando se inicia la reacción el metóxido sódico es ionizado formando un grupo alcóxido y un catalizador protonado (figura 1.3 B). Posteriormente el alcóxido ataca al grupo carbonilo del triglicérido generando un intermediario tetraédrico inestable que se estabiliza formando un ion diglicérido y un éster metílico (Figura 1.3 C). El ion diglicérido reacciona con una molécula de metanol para formar un diglicérido y un alcóxido (Figura 1.3 D). Los diglicéridos y monoglicéridos continúan el mismo mecanismo hasta la formación de glicerol con la consecuente liberación de ésteres metílicos. El catalizador protonado puede reaccionar con una segunda molécula de alcohol, comenzando otro ciclo catalítico [29].

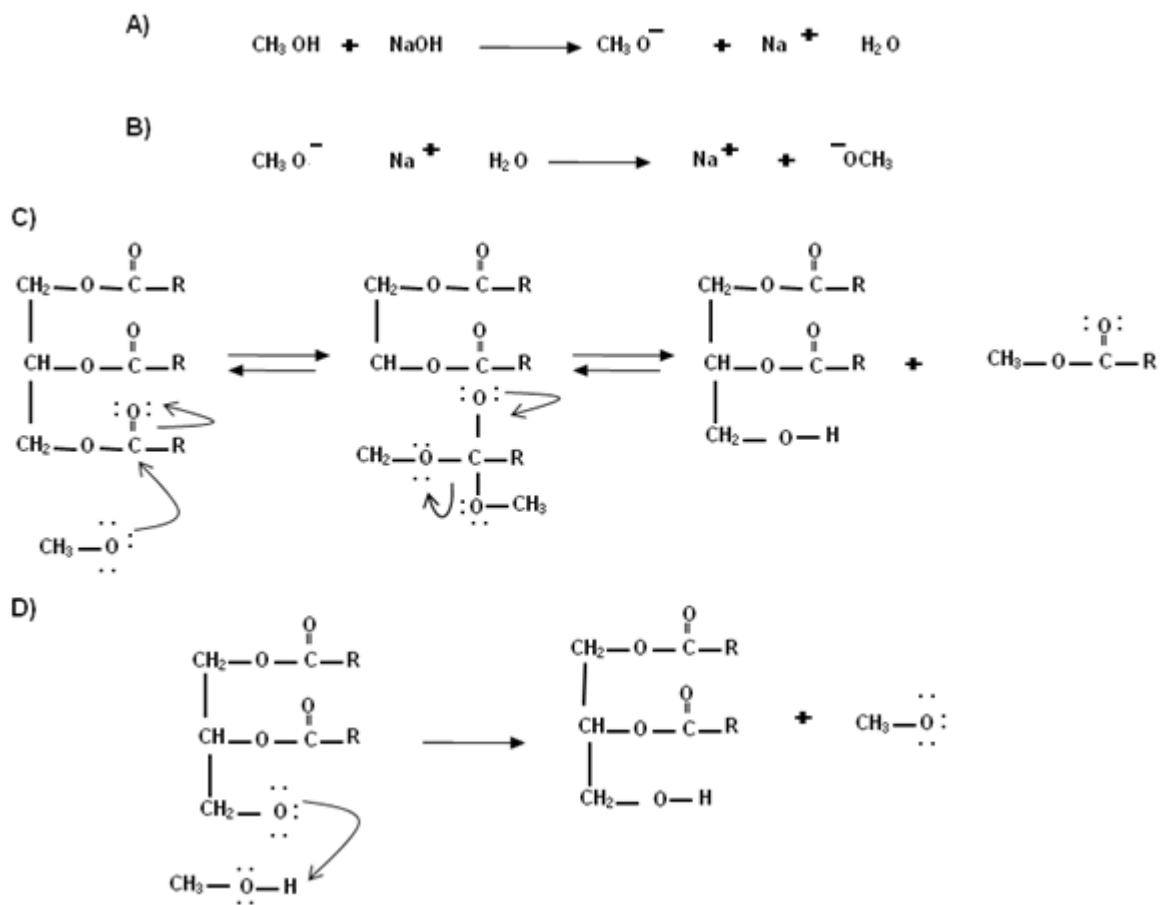


Figura 1.3. Reacción de transesterificación. A) Formación de metóxido sódico, B) Ionización de metóxido sódico, C) Formación del ion diglicérido y un éster metílico, D) Formación de un diglicérido y un alcóxido [29].

La reacción de transesterificación en general requiere tres moles de metanol y un mol de triglicérido, para obtener tres moles de ésteres metílicos de ácido graso y un mol de glicerol. En procesos industriales se usan seis moles de metanol por cada mol de triglicéridos, ya que con este exceso de metanol se asegura que la reacción se conduzca en la dirección de formación de los ésteres de metilo, y una vez terminado el proceso el alcohol utilizado se recupera y recicla para su uso nuevamente[3].

1.4 Cultivo de especies de microalgas verdes para la producción de biodiesel

Se ha señalado que las microalgas verdes se están perfilando como la mejor alternativa como fuente de materia prima para la producción de biodiesel [30, 31]. Las microalgas

verdes son organismos unicelulares fotosintéticos que convierten la luz del sol, el agua y el dióxido de carbono en biomasa (materia orgánica), por ello son consideradas responsables de gran parte de la fijación del dióxido de carbono presente en la atmósfera [3]. Una variedad de especies de microalgas verdes son ricas en aceites como se muestra en la tabla 1.3.

Tabla 1.3 Contenido de aceites de algunas microalgas [3].

Microalga	Contenido de aceite (% de peso seco celular)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella sp.</i>	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

Las microalgas secas retienen sus aceites en el citosol, los que pueden extraerse mediante prensado y en combinación con solventes como hexano, benceno y éter. Con la combinación de estos dos procesos, es posible obtener alrededor del 90% del aceite contenido en las algas [32]. La productividad de aceite de muchas microalgas excede grandemente la del mejor cultivo agrícola, sin embargo, todavía falta mejorar la tecnología de producción que permita hacer económicamente factible la obtención del biocombustible a partir de ellas [26].

1.4.1 Ventajas de las microalgas verdes sobre plantas superiores como materia prima para obtener biodiesel

Las microalgas presentan varias ventajas sobre los cultivos de plantas superiores como fuente de materia prima para biodiesel. En cuanto a la eficiencia fotosintética y el potencial de crecimiento de las microalgas, los cálculos teóricos indican que una producción anual de aceite mayor de 30,000 L, o alrededor de 200 barriles de aceite de algas por hectárea de tierra pueden ser viables, ya que es 100 veces mayor que la productividad de la soya, la cual es una de las principales materias primas utilizada en los Estados Unidos para la producción de biodiesel [6].

Otras ventajas se mencionan a continuación:

- Pueden sintetizar y acumular grandes cantidades de lípidos/aceites neutros (20-50% peso seco celular) principalmente en forma de triglicéridos, bajo condiciones ambientales desfavorables o de estrés; además presentan altos índices de crecimiento (1-3 duplicaciones por día) lo que se traduce en mayor biomasa [33].
- En su cultivo se pueden utilizar tierras marginales (por ejemplo, el desierto, las zonas áridas y semiáridas) que no son aptos para la agricultura convencional.
- Pueden utilizar nutrientes de crecimiento como el nitrógeno y el fósforo a partir de una variedad de fuentes de aguas residuales (por ejemplo, de la agricultura, aguas residuales industriales, municipales, etc.), lo que aporta el beneficio adicional de bio-remediación de aguas residuales.
- Tienen la capacidad de secuestrar dióxido de carbono, reduciendo de esta forma las emisiones de CO₂, el principal causante del efecto invernadero, de forma rápida y eficiente, ya que por cada Kg de biomasa seca se fijan aproximadamente 1.8 Kg de CO₂.

- Tienen el potencial de producir subproductos con valor agregado (por ejemplo fertilizante, alimento para animales, pigmentos, polisacáridos, biopolímeros, proteínas e H₂).
- Pueden ser cultivadas en contenedores cerrados (Fotobiorreactores) a lo largo de todo el año con una productividad de biomasa anual, la cual podría exceder en teoría la de plantas superiores por décuplo aproximadamente.

1.4.2 Implementación de biorrefinerías a partir del cultivo de microalgas como materia prima para la obtención de biodiesel

De manera similar a una refinería de petróleo, una biorefinería utiliza todos los componentes de la biomasa para fabricar productos utilizables. Algunas biorefinerías ya están siendo operadas en Canadá, Estados Unidos y Alemania para la producción de biocarburantes y otros productos a partir de cultivos tales como el maíz y la soya. Este enfoque podría ser utilizado para reducir los costos de producción de biodiesel a partir de aceites de microalgas (Figura 1.4), ya que además, la biomasa de las microalgas contiene importantes cantidades de proteínas, carbohidratos y otros nutrimentos (Tabla 1.4) [33].

La composición de la biomasa de microalgas secas contiene hasta un 46% de carbono (C), 10% de nitrógeno (N) y 1% de Fosfatos (P), por lo tanto, la biomasa residual resultante del proceso de producción de biodiesel puede ser potencialmente utilizada como alimento para animales y después de un proceso de digestión anaerobia se puede utilizar como fertilizante en forma de composta o como biogás, de esta forma se estaría obteniendo un segundo biocombustible (Figura 1.4). Sin embargo, el tipo de solvente utilizado durante el proceso de extracción de lípidos y el proceso de transesterificación puede tener un efecto importante sobre la producción de metano (principal componente del biogás), pues se sabe que el uso de cloroformo como solvente para la extracción de lípidos ocasiona una represión en la producción de metano [34]. Como una solución a este problema, Ehimen *et al.* [34] proponen realizar un lavado a la biomasa residual antes del proceso de digestión anaerobia.

Tabla 1.4. Composición química de algunas microalgas en base al peso seco (%) [35].

Especie	Proteína	Carbohidratos	Lípidos	Ácidos nucleicos
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 – 56	10 -1 7	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21 - 52	16 – 40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 – 58	12-17	14 – 22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33 - 64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39 – 61	14 - 18	14 -20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28- 45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28 - 39	40 - 57	9-14	2.5
<i>Spirulina platensis</i>	46 - 63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60 - 71	13 - 16	6- 7	3 – 4.5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43 - 56	25 - 30	4- 7	-

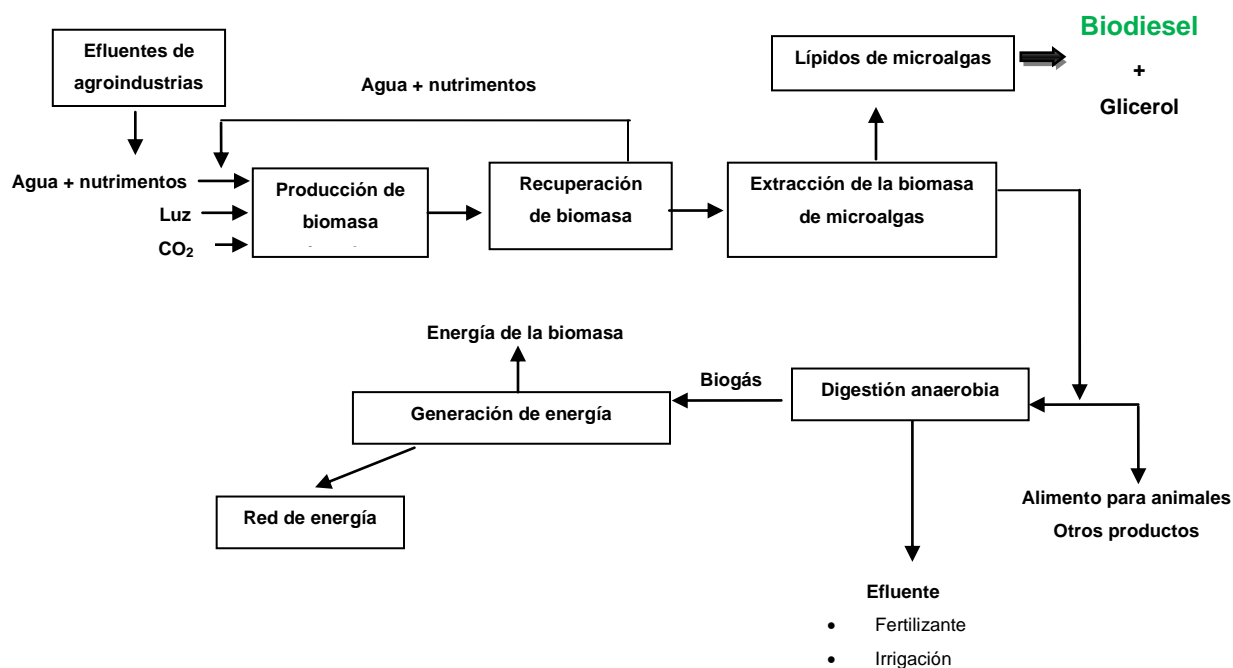
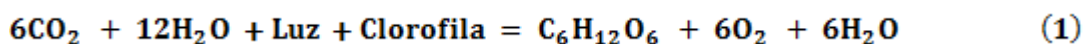


Figura 1.4. Esquema de producción de biodiesel a partir de microalgas [33].

Por otra parte diversos estudios han reportado que para obtener 1kg de biomasa seca de microalgas se requiere de 1.7 kg a 1.8 Kg de CO₂ [6, 33], igualmente Weissman y Tillett estudiaron la captura de CO₂ en estanques, cuando estos operaban en condiciones óptimas y obtuvieron un 99% de eficiencia de la captura de este gas. En base a la siguiente ecuación, 1.57 g de CO₂ son necesarios para producir 1g de glucosa [36]



En otro estudio, Kurano *et al.* [37] reportaron la fijación de 4 g de CO₂ L⁻¹ día⁻¹ con tasas de crecimiento de 2.5 g⁻¹ L⁻¹día⁻¹ de microalgas, y mencionaron que teniendo en cuenta la conversión de glucosa en otros compuestos tales como lípidos y almidón bajo ciertas condiciones, el consumo de CO₂ puede ser de hasta 2 g de CO₂ por gramo de microalgas. Suponiendo una tasa de crecimiento de 50 g⁻¹ m⁻² día⁻¹ es posible que una hectárea de cultivo de microalgas en estanques pueda retener hasta una tonelada de CO₂ por día.

Así, proyectos de producción de biodiesel utilizando microalgas como materia prima pueden calificar como Mecanismo de Desarrollo Limpio (MDL) y traer ingresos adicionales a través de la venta de Certificados de Reducción de Emisiones (CER) [33].

1.5 Lípidos en microalgas verdes

1.5.1 Metabolismo de lípidos en microalgas verdes

El metabolismo de los lípidos, particularmente las vías de biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, ha sido pobremente estudiado en microalgas en comparación a las plantas. Sin embargo, basándose en características bioquímicas como número de genes y/o enzimas aisladas en microalgas y en plantas superiores involucradas en el metabolismo de los lípidos, generalmente, se sugiere que las vías de biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos son directamente análogos a los observados en plantas superiores [6].

En microalgas la síntesis de ácidos grasos ocurre principalmente en el cloroplasto. En la figura 1.5 se muestran un esquema generalizado para la biosíntesis de ácidos grasos. En general la vía produce ácidos grasos de 16 ó 18 carbonos o ambos. Estos entonces son usados como los precursores para la síntesis de lípidos de almacenamiento,

principalmente TAG que pueden acumularse en cloroplasto y en las membranas celulares en condiciones ambientales de crecimiento adversas o sub-óptimas.

El paso dilicado en la síntesis de ácidos grasos es la conversión de acetil-CoA en malonil CoA, catalizada por la acetil CoA carboxilasa (ACCasa). En el cloroplasto, la fotosíntesis proporciona una fuente endógena de acetil-CoA, y una vía que puede contribuir a mantener el depósito de acetil CoA. En plantas oleaginosas, una ruta principal de flujo de carbono a la síntesis de ácidos grasos puede implicar la glucólisis citosólica a fosfoenolpiruvato (PEP, por sus siglas en inglés), que entonces preferencialmente es transportado del citosol al plástido, en el que es convertido a piruvato y por consiguiente a acetil CoA. En microalgas verdes, como la glucólisis y el piruvato quinasa (PK), que cataliza la síntesis irreversible de piruvato del PEP, ocurren en el cloroplasto además del citosol. Una ACCasa es generalmente considerada para catalizar la primera reacción de la vía de biosíntesis del ácido graso, la formación de malonil CoA a partir de acetil CoA y CO_2 . Esta reacción ocurre en dos pasos y es catalizada por un solo complejo enzimático. En el primer paso, el cual es dependiente de ATP, el CO_2 (de HCO_3^-) es transferido por la biotina carboxilasa del grupo prostético de la ACCasa a un nitrógeno de un grupo proteico de biotina adjunta el grupo ϵ -amino de un residuo de la lisina. En el segundo paso, catalizado por la carboxiltransferasa, el CO_2 activado es transferido de la biotina a acetil CoA para formar malonil CoA [6.]

Según Ohlrogge y Navegador [38], la malonil CoA, el producto de la reacción de carboxilación, es el donante central de carbono para la síntesis de ácidos grasos. El grupo malonil es transferido de CoA a un co-factor de proteína sobre la proteína transportadora de acilo (Figura 1.5). Todas las reacciones subsecuentes de la vía implican ACP hasta que los productos finales estén listos para la transferencia a glicerolípidos o exportación del cloroplasto. El grupo malonil del malonil ACP participa en una serie de reacciones de condensación con aceptores acilo ACP (o acetil CoA). La primera reacción de condensación forma un producto de cuatro carbonos, y es catalizada por la enzima que se condensa, ACP 3-cetoacil sintasa III (KAS III) [39]. Otra enzima de condensación, KAS I, es responsable de producir longitudes de cadena que varían (6-16 carbonos). Tres reacciones adicionales ocurren después de cada condensación. Para formar un ácido

graso saturado la enzima 3-cetoacil reductasa reduce el producto 3-cetoacil ACP, deshidratado por hydroxiacil ACP deshidratasa y luego reducido por la enzima enoil ACP reductasa (Figura 1.5). Estas cuatro reacciones conducen a un alargamiento del precursor de ácido grasos en dos carbonos. La vía de biosíntesis produce ácidos grasos saturados de 16:0- y 18:0-ACP. Para producir un ácido graso insaturado, un doble enlace es introducido por la enzima soluble estearoil ACP desaturasa. La elongación de ácidos grasos es terminada cuando el grupo acilo es removido de ACP por un acil-ACP tioesterasa que hidroliza el acylo ACP y libera el ácido graso libre. La aciltransferasa en el cloroplasto transfiere el ácido graso directamente de ACP a glicerol-3-fosfato o monoacilglicerol-3-fosfato [38]

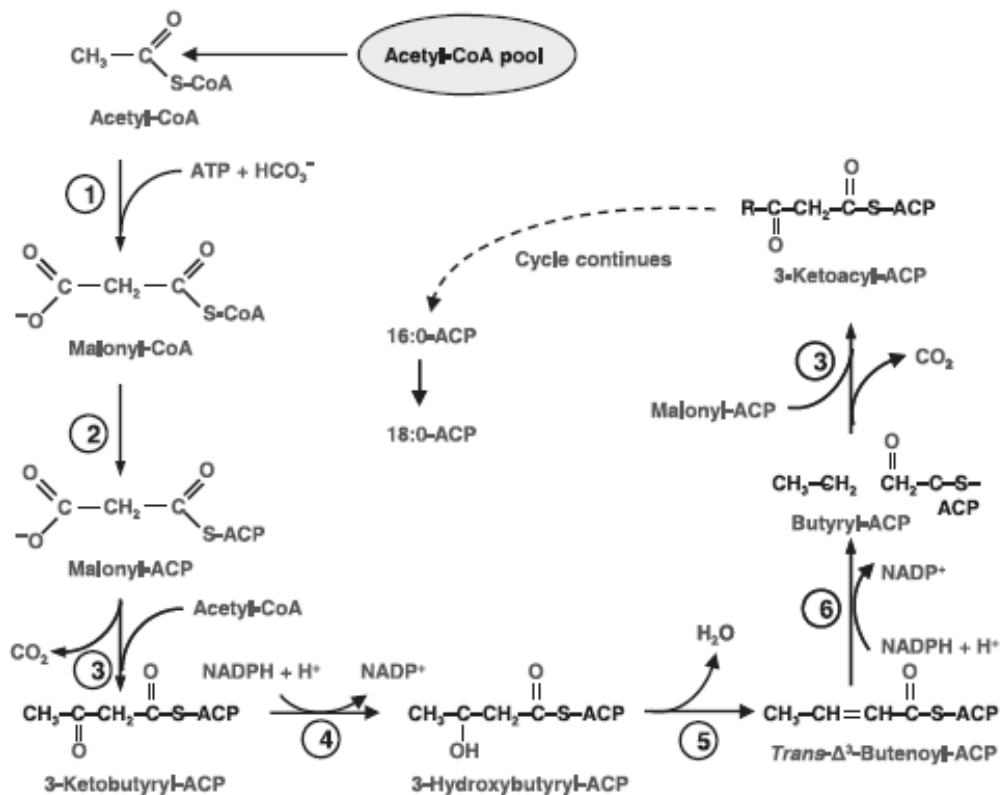


Figura 1. 5. Ruta de síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto [6].

La biosíntesis de triglicéridos en las algas se ha propuesto que ocurra por la vía directa del glicerol (Figura 1.6). Los ácidos grasos producidos en el cloroplasto son secuencialmente transferidos de CoA (coenzima A) a las posiciones 1 y 2 del glicerol-3-

fosfato lo que resulta en la formación del metabolito central ácido fosfatídico (PA). La desfosforilación del PA catalizada por una fosfatasa específica libera diacilglicerol (DAG). En el paso final de la síntesis de TAG un tercer ácido graso es transferido a la posición vacante 3 del DAG y esta reacción es catalizada por la diglicerol acetiltransferasa, una reacción enzimática que es única para la biosíntesis de triglicéridos [6].

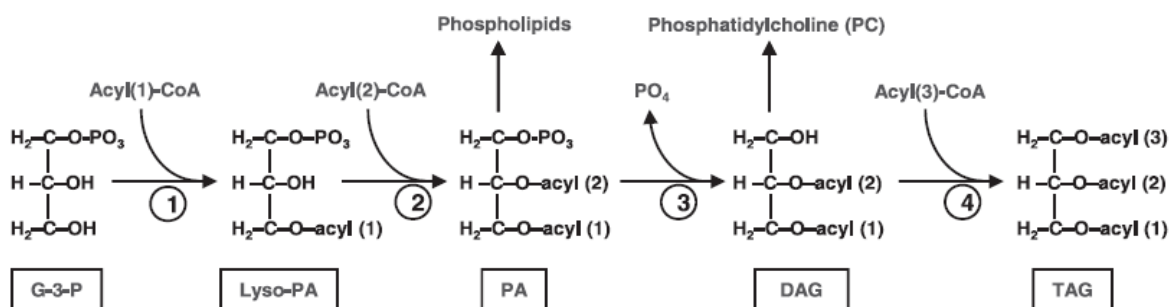


Figura 1.6. Esquema simplificado de la vía de biosíntesis de triglicéridos en algas. (1) Citosol glicerol-3-fosfato acyl transferasa, (2) lyso ácido fosfatídico acyl transferasa, (3) ácido fosfatídico fosfatasa y (4) diglicerol acyl transferasa [19].

Diversos estudios [40, 41, 42] han demostrado que el contenido de glicerol en las microalgas aumenta cuando éstas son sometidas a estrés osmótico, ya que el glicerol funciona como un osmorregulador. Sustancias como NaCl y KCl en concentraciones altas (50 a 200 mM, dependiendo de la especie de microalga) en el medio de cultivo causan estrés, haciendo que se produzca un efecto inhibitorio para el metabolismo fotosintético, lo cual reduce los niveles de almidón, fosfatos, lactatos y glicolato, pero causan un aumento del glicerol intracelular y en el medio de cultivo.

Otros estudios como el realizado por Takagi *et al.*, [43] indican que no sólo el contenido de glicerol aumenta al someter a las microalgas a estrés osmótico, sino que también los contenidos de los lípidos aumentan, esto se cree que ocurre debido a que el estrés osmótico causa un aumento en la producción de glicerol en las microalgas con el fin de mantener el balance osmótico. Como el glicerol es el precursor de los triglicéridos, se piensa que parte de este glicerol producido de más se sintetiza como triglicérido, causando un aumento en la producción de éstos.

1.5.2 Contenido de lípidos y triglicéridos en microalgas verdes

Las algas verdes oleaginosas muestran en promedio un contenido total de lípidos de 25.5% de peso seco celular y este contenido de lípidos aumenta considerablemente, se duplica o triplica, cuando las células se sujetan a ciertas condiciones de estrés durante el cultivo, tales como el fotooxidativo o la inanición de nutrientes. En promedio se ha observado que el contenido de lípidos totales llega hasta un 45.7% en peso seco cuando las algas verdes oleaginosas se cultivan bajo condiciones de estrés [6].

Por su parte, en estudios con microalgas oleaginosas de las diatomeas [6], se ha observado que su contenido promedio de lípidos es de aproximadamente 22.7% de peso celular seco, cuando se mantienen en condiciones de cultivo normales, mientras que un contenido promedio de lípidos aproximado de 44.6% de peso celular seco se ha observado cuando se mantienen en condiciones de estrés durante su cultivo.

De todos los nutrientes que se han estudiado, la limitación de nitrógeno, fósforo o azufre son los nutrientes que afectan el metabolismo de los lípidos en las microalgas y por lo tanto promueven su acumulación.

Se ha observado que el estrés por deficiencia o disminución de nitrógeno provoca en las microalgas una disminución de la eficiencia fotosintética, cambios fisiológicos que reducen la eficacia para recolectar la luz, la transducción de energía, la fijación de CO₂, al igual que cambios en la tasa de crecimiento, el volumen celular y la composición bioquímica [44, 45, 46]. Por otra parte, se ha encontrado que la temperatura tiene un efecto importante sobre la composición de ácidos grasos de las algas. En este sentido, se ha observado una tendencia general hacia el aumento de insaturación de ácidos grasos con la disminución de la temperatura, así como un aumento de ácidos grasos saturados con el aumento de temperatura en muchas algas y cianobacterias. Las algas cultivadas en varias intensidades de luz presentan cambios notables en su composición química, el contenido de pigmento y la actividad fotosintética. Con respecto a la intensidad lumínica, se ha observado que una baja intensidad de luz induce la formación de lípidos polares, en particular los lípidos polares de la membrana asociados con el cloroplasto, mientras que la alta intensidad de luz disminuye el contenido de lípidos polares con un aumento

concomitante en cantidad de lípidos de almacenaje neutros, principalmente TAGs [6]. En cuanto a estrés por pH, en un estudio realizado por Guckert y Cooksey [47] se sometió a una microalga del género *Chorella* a estrés de pH alcalino y se observó un aumento de los triglicéridos. Se ha propuesto que el estrés de pH alcalino afecta la acumulación de lípidos inhibiendo el ciclo de división celular antes de la liberación de la autoespora y por lo tanto antes de la utilización de los triglicéridos. De esta forma se sugirió que a pH altos los triglicéridos aumentan y los lípidos de las membranas como glicolípidos y lípidos polares disminuyen [47].

1.5.3 Composición de ácidos grasos en microalgas verdes

Bajo condiciones normales de crecimiento, las algas sintetizan ácidos grasos como componentes básicos para la formación de varios tipos de lípidos (por ejemplo, fosfolípidos y glicolípidos) [47]. Los ácidos grasos más comúnmente sintetizados tienen longitudes de cadena que se extienden de C16 a C18 (Tabla 1.2) [6], similar a aquellos de plantas superiores.

Los ácidos grasos son saturados, insaturados o poliinsaturados. Los ácidos grasos insaturados pueden variar en el número y la posición de dobles enlaces sobre la cadena de carbón, y los poliinsaturados contienen dos o más dobles enlaces. En general, ácidos saturados y monoinsaturados son predominantes en la mayoría de las algas; en las algas verdes oleaginosas los ácidos grasos encontrados son principalmente C16:0 (Palmítico) y C18:1 (Oleico) [6].

1.6 *Chlamydomonas reinhardtii*

1.6.1 Características generales de *C. reinhardtii*

El género *Chlamydomonas* comprende algas unicelulares fotosintéticas, que poseen dos flagelos en el cuerpo basal, un cloroplasto rodeando uno o más pirenoides, y una pared celular como se observa en la figura 1.7 [48].

Las microalgas *C. reinhardtii* se clasifican de la siguiente manera (www.algaebase.org):

Dominio: Eucariota

Reino: Plantae

Subreino: Viridiaeplantae

División: Chlorophycophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Volvocales

Familia Chlamydomonadaceae

Género: Chlamydomonas

Especie: *Chlamydomonas reinhardtii*

Las especies de *Chlamydomonas* han sido definidas solamente en base a criterios morfológicos, la forma del tamaño global del cuerpo, la forma y la ubicación del cloroplasto y pirenoides, el largo de los flagelos, número y posición de vacuolas contráctiles. En particular, *Chlamydomonas reinhardtii* crece en agua dulce y tiene un tamaño promedio de 10 µm de largo (con variaciones significativas a través de su ciclo celular). *C. reinhardtii* ha tenido un amplio uso como modelo experimental para diversos estudios en biología celular y molecular. La capacidad de esta microalga de crecer heterotróficamente con acetato como su única fuente de carbono ha hecho que esta especie sea de gran utilidad para la investigación de la biogénesis y función del cloroplasto. Los ciclos de multiplicación vegetativa y sexual son fáciles de manipular en el laboratorio, por lo que este organismo es un instrumento poderoso para el análisis genético de la fotosíntesis, así como muchas otras funciones celulares [49]. Las células de *C. reinhardtii* son haploides, su población crece logarítmicamente en períodos de luz-oscuridad (12:12), se dividen simultáneamente (por lo general) durante el período de oscuridad; en condiciones óptimas de laboratorio con suficiente luz la fase estacionaria es alcanzada con aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Se ha sugerido que las microalgas del género *Chlamydomonas* contienen todos los ácidos grasos característicos de tejidos fotosintéticos eucarióticos superiores y también algunos ácidos grasos inusuales [50]. En un estudio realizado por Morowvat *et al.* [51], con microalgas del género *Chlamydomonas*, se obtuvieron los ésteres metílicos:

nonanoico, docosanoico, dedecanoico, tetradecanoico, hexadecanoico, tetracosanoico, icosanoico, heneicosanoico, pentadecanoico, por estos motivos se considera que tiene potencial para la obtención de biodiesel.

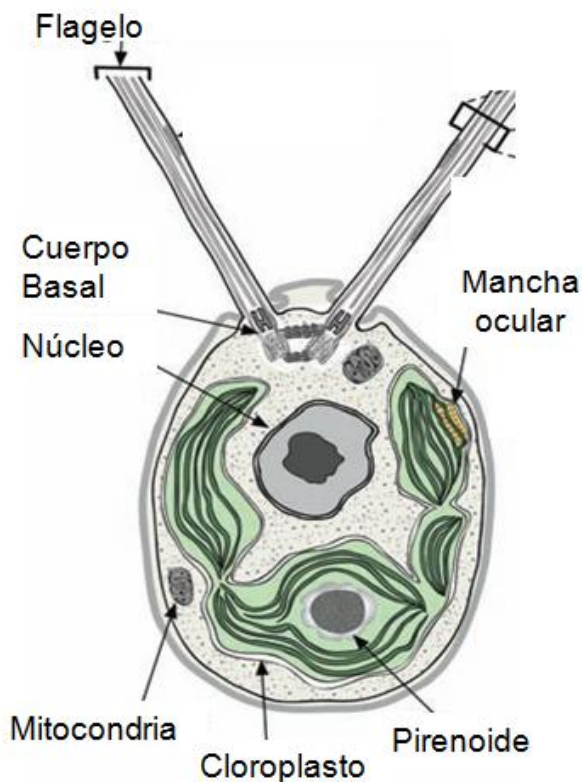


Figura 1.7. Estructura celular de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* [52].

1.6.2 Lípidos encontrados en *Chlamydomonas reinhardtii*

Los lípidos obtenidos de microalgas han sido de gran interés porque contienen triglicéridos que pueden ser transesterificados usando tecnología convencional. Se ha mencionado que *C. reinhardtii* contiene 21 % de lípidos del peso seco [35]. Estos lípidos están formados en su mayoría por triglicéridos (Tabla 1.5), y los ácidos grasos saturados de 16 carbonos integran una gran parte de los lípidos presentes en esta microalga (Tabla 1.6) [53].

Tabla 1.5. Composición de los lípidos (% molar) en *Chlamydomonas reinhardtii* [53].

Lípidos	Composición (% molar)
Triglicéridos	37
MGDG	25
DGDG	6
SQDG	25
PG	3
PI	tr ^a
DGTS	4

En el que: MGDG es Monogalactosildiacilglicerol, DGDG es Digalactosildiacilglicerol, PG es Fosfatidilglicerol, SQDG es Sulfoquinovosildiglicerido, DGTS es Digliciltrimetilhomoserina, PE es Posfateletanolamina y PI es fosfatidilinositol. tr^a (trazas) < 1% del total de lípidos.

Tabla 1.6. Composición de ácidos grasos del total de lípidos de *Chlamydomonas reinhardtii* (los ácidos grasos son designados por el número de carbonos: número de dobles enlaces) [53].

Ácido graso		
Nombre común	Abreviatura	Composición (% mol)
Mirístico	C14:0	4
Palmítico	C16:0	36.1
Palmitoléico	C16:1	1.8
Esteárico	C18:0	4.4
Oleico	C18:1	13.3
Linoléico	C18:2	17.8
Linolénico	C18:3	20.5
Estearidónico	C18:4	2.1
Σ de ácidos grasos saturados ^a		44.5
Σ de ácidos grasos insaturados ^b		55.5

^a Porcentaje de ácidos grasos saturados, ^b Porcentaje de ácidos grasos insaturados

1.7 El género *Chlorella*

1.7.1 Características de *Chlorella saccharophila*

Las microalgas pertenecientes al género *Chlorella* son esféricas, unicelulares de agua dulce, de color verde y de unas 6 μ m de diámetro (Figura 1.8). Fue descubierta hasta 1890 por el microbiólogo holandés M. W. Beijernick; se ha sugerido que estas microalgas tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de biomasa debido a su

extraordinaria capacidad reproductiva, ya que una sola célula de *Chlorella* puede dividirse 4 veces cada 20 horas [54].

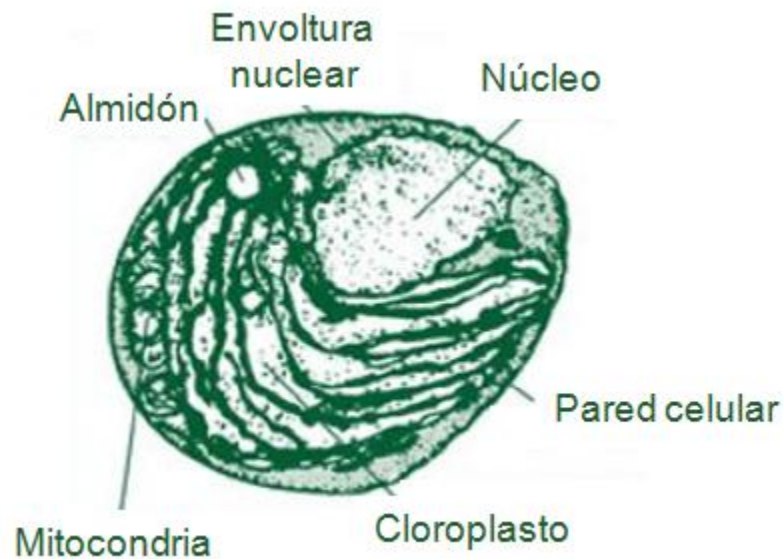


Figura 1.8. Estructura celular de la microalga del género *Chlorella* [54].

La microalgas de la especie *Chlorella saccharophila* se clasifican de la siguiente manera (www.algaebase.org):

Dominio: Eucariota

Reino: Plantae

Subreino: Viridaeplantae

División: Chlorophycophyta

Clase: Trebouxiophyceae

Orden: Chlorellales

Familia Chlorellaceae

Género: Chlorella

Especie: *Chlorella saccharophila*

En particular, las microalgas de la especie *C. saccharophila* han sido poco estudiadas. Hasta donde se ha revisado en la literatura no existen reportes sobre su producción de

lípidos y su potencial como materia prima para la producción de biodiesel. Los únicos estudios que se han realizado con esta especie de microalgas han sido enfocados a su capacidad para secuestrar metales pesados como zinc y plomo [55], a su clasificación de acuerdo a las propiedades de su pared celular debidas a la composición de los azúcares [56], y para el estudio de la obtención de protoplastos [57]. Sin embargo con otras microalgas de este mismo género si se han realizado estudios sobre sus lípidos y su potencial como materia prima para producción de biodiesel, como en el caso de las microalgas de la especie *Chlorella protothecoides*. Estas microalgas cultivadas utilizando un método heterotrófico (con fuente orgánica de carbono), dan lugar a la acumulación de una gran cantidad de lípidos en las células, más de 55.2% de su peso celular seco [58]. Por otro lado, se ha observado que en el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* con niveles bajos de nitrógeno su reproducción es baja, pero el tamaño de las células es mayor en comparación a cultivos bajo condiciones óptimas. Por otra parte se presenta un incremento significativo en el contenido de lípidos de 18 a 40% de su peso celular seco y una reducción de proteína de 29 a 7% de su peso celular seco [31]. En un estudio realizado con *Chlorella vulgaris* por Widjaja *et al.* [30] se analizaron factores importantes como el efecto de la concentración de CO₂, y nitrógeno, así como el método de extracción de lípidos, para tratar de explicar cómo estos factores afectan tal producción. Los resultados obtenidos mostraron que en condiciones de estrés a bajos niveles de nitrógeno, la productividad de lípidos aumentó, además de beneficiar la producción de lípidos totales. Por otra parte se observó que la composición de los lípidos fue cambiando gradualmente de aquellos ricos en ácidos grasos libres a otros ricos en triglicéridos. En cuanto al efecto del CO₂, se sugirió que juega un papel importante en la productividad de los lípidos, ya que el crecimiento de la microalgas se ve afectado positivamente por el aumento de la concentración de CO₂. En lo que respecta al método de extracción se ha sugerido que la utilización del solvente hexano para la extracción resulta en un bajo rendimiento de lípidos, mientras que utilizando la mezcla de solventes cloroformo/metanol se obtiene un mejor rendimiento de lípidos.

1.7.2 Lípidos encontrados en microalgas del género *Chlorella*

De los ácidos grasos que contiene esta microalga, casi el 80% son de tipo insaturado [47]. En un estudio realizado por Cleber *et al.* [59] en el que la microalga *Chlorella vulgaris* fue cultivada en diferentes medios, se encontró que los contenidos de lípidos no mostraron una diferencia significativa de un medio a otro y que de todos los ácidos grasos presentes en esta microalga los predominantes fueron los C-16:0, C-18:0, C-18:1 y C-18:3n-6 (tabla 1.7), lo cual es bueno, ya que el biodiesel proveniente de triglicéridos formados por este tipo de ácidos grasos se considera de buena calidad.

Tabla 1.7. Ácidos grasos encontrados en *Chlorella vulgaris* [59].

Nombre común	Abreviatura
Mirístico	C14:0
Miristoléico	C14:1
Palmítico	C16:0
Palmitoléico	C16:1
Margárico	C17:0
Heptadecenoico	C17:1
Esteárico	C18:0
Oléico	C18:1
Linoléico	C18:2
Linolénico	C18:3
Araquídico	C20:0
Eicosanoico	C20:1
Eicosadienoico	C20:2
Eicosatrienoico	C20:3
Eicosapentaenoico	C20:5
Eurístico	C22:1
Nervónico	C24:0
Decosaheptanoico	C22:6

1.8 Justificación

Ante los cambios climáticos, y la crisis en los derivados del petróleo, se hace necesario dentro de los temas de mitigación, explorar nuevas posibilidades, tales como las que se presentan en este estudio. Hoy en día los biocombustibles representan una buena alternativa para sustituir el uso de combustibles de origen fósil en el transporte, con lo cual también se estaría ayudando a mejorar el medio ambiente; no obstante, biocombustibles como el etanol lignocelulósico, el biogás, y el biohidrógeno aún presentan problemas en sus tecnologías de elaboración. Por su parte, actualmente el biodiesel a partir de microalgas se ha presentado como una alternativa muy prometedora, ya que las microalgas tienen altos contenidos de lípidos, además de que pueden acumular grandes cantidades de biomasa en un corto tiempo en comparación a los cultivos oleaginosos. Sin embargo, existen factores importantes que pueden afectar (positiva o negativamente) el cultivo de las microalgas y su acumulación de lípidos, que no han sido estudiados en su totalidad. Es por ello, que en este trabajo se han evaluado las posibilidades de utilización como materia prima para obtención de biodiesel de dos especies de microalgas verdes de agua dulce, una que ha sido utilizada como modelo de estudio por más 60 años, y otra nativa del Estado de Yucatán: *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella saccharophila* respectivamente. La primera es originaria del aislamiento realizado en Amherst, Massachusetts, en 1945, proporcionada por la Dra. Elizabeth H. Harris y la segunda se aisló de un cuerpo de agua de la ciudad de Mérida, Yucatán, proporcionada por la Q.F.B. Silvia J. López Adrián.

1.9 Hipótesis

Es posible obtener ésteres metílicos a partir de las microalgas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella saccharophila*, que posean las características adecuadas para su uso como biodiesel, y su contenido pueda incrementarse mediante condiciones de estrés por disminución de la fuente de nitrógeno, pH alcalino, y estrés osmótico por NaCl en el cultivo.

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo general

- Evaluar las posibilidades de utilización de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella saccharophila*, como fuentes de obtención de biodiesel

1.10. 2 Objetivos específicos

- Analizar el perfil de ésteres metílicos de *Chlamydomonas reinhardtii* y su variación en respuesta a estrés por disminución de la fuente de nitrógeno, estrés por pH alcalino, y estrés osmótico por NaCl.
- Analizar el perfil de ésteres metílicos de *Chlorella sacharophila* y su variación en respuesta a estrés por disminución de la fuente de nitrógeno, estrés por pH alcalino, y estrés osmótico por NaCl.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1 Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos del presente trabajo se siguió el diseño experimental que se presenta en la figura 2.1.

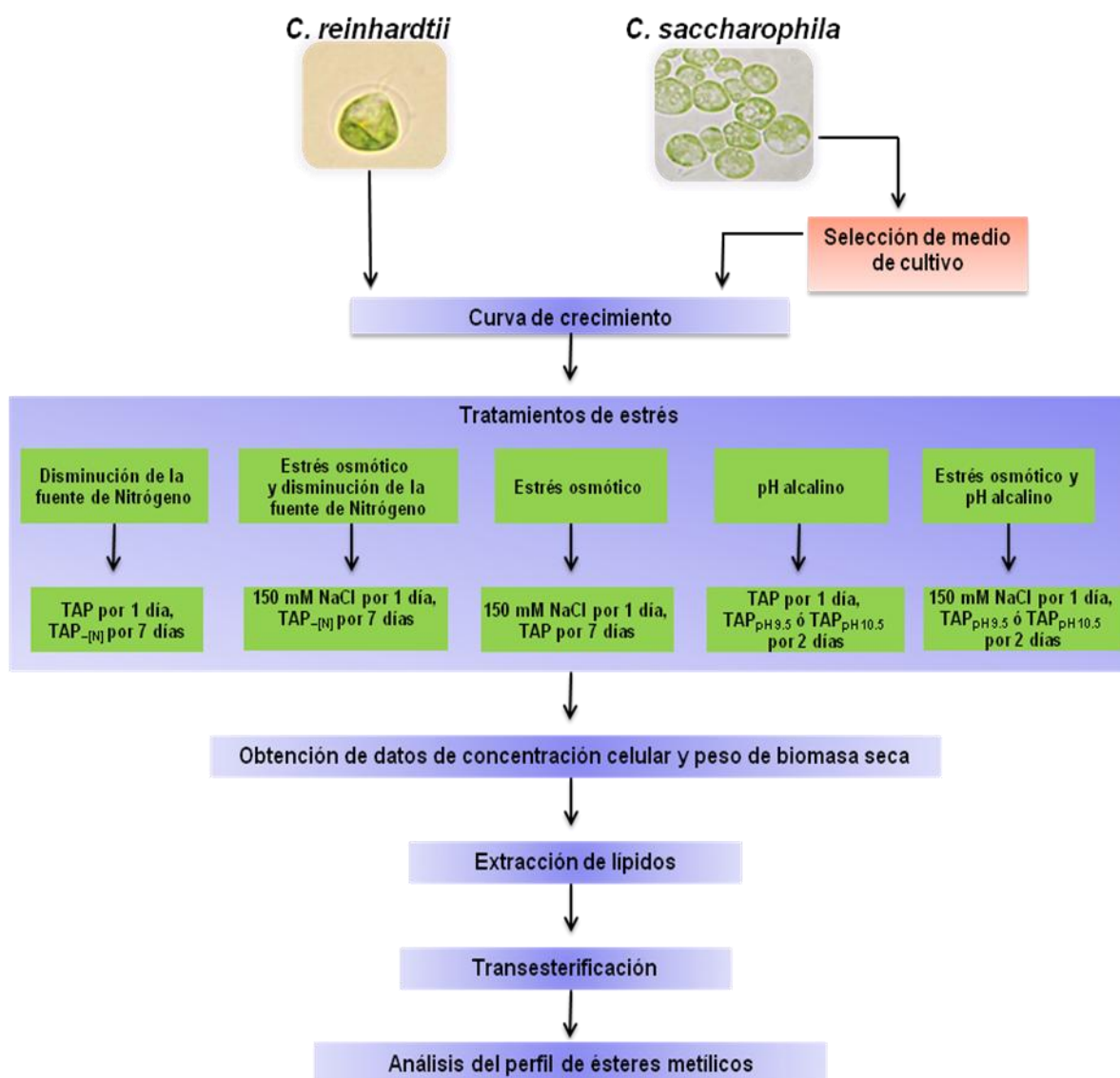


Figura 2.1. Diseño experimental.

Al inicio se buscó el medio óptimo de cultivo para *Chlorella saccharophila* como se describe más adelante. Se realizó una curva de crecimiento para las dos especies de

microalgas contempladas en este estudio, con el fin de conocer el tiempo óptimo de cultivo en el cual se presenta la mayor concentración celular. Posteriormente, para cada especie de microalga se realizaron experimentos de dosis-respuesta con los tratamientos de estrés como se describe a continuación:

Tratamiento de NaCl.- al cultivo de 7 días (*C. reinhardtii*) ó 10 días (*C. saccharophila*) se adicionaron 9 mL de la solución 1 M de NaCl y 1 mL de medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato), para obtener una concentración de 150 mM de NaCl en el medio de cultivo, y se mantuvo bajo esta condición de estrés osmótico por 1 día. Posteriormente se recuperó la biomasa resultante por centrifugación, se resuspendió en medio TAP y se mantuvo esta condición por 2 ó 7 días dependiendo si se llevaba a cabo al mismo tiempo que los tratamientos de pH o de N.respectivamente.

Tratamiento de N.- al cultivo de 7 días (*C. reinhardtii*) ó 10 días (*C. saccharophila*) se adicionaron 10 mL de medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato), y se mantuvo bajo esta condición de estrés osmótico por 1 día. Posteriormente se recuperó la biomasa por centrifugación, se resuspendió en medio TAP_{-[N]}, y se mantuvo esta condición de estrés por disminución de la fuente de nitrógeno durante 7 días.

Tratamiento de pH.- al cultivo de 7 días (*C. reinhardtii*) ó 10 días (*C. saccharophila*) se adicionaron 10 mL de medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato), y se mantuvo bajo esta condición de estrés osmótico por un 1 día. En seguida se recuperó la biomasa por centrifugación, se resuspendió en medio TAP_{pH 9.5} ó TAP_{pH10.5} (según el pH evaluado) y se mantuvo esta condición de estrés por pH alcalino (9.5 ó 10.5) por 2 días.

Tratamiento de NaCl/N.- al cultivo de 7 días (*C. reinhardtii*) ó 10 días (*C. saccharophila*) se adicionaron 9 mL de la solución 1 M de NaCl y 1 mL de medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato), para obtener una concentración de 150 mM de NaCl en el medio de cultivo y se mantuvo bajo esta condición de estrés osmótico por 1 día. Posteriormente se recuperó la biomasa por centrifugación, se resuspendió en medio TAP_{-[N]}, y se mantuvo esta condición de estrés por disminución de la fuente de nitrógeno por 7 días.

Tratamiento NaCl/pH.- al cultivo de 7 días (*C. reinhardtii*) ó 10 días (*C. saccharophila*) se adicionaron 9 mL de la solución 1 M de NaCl y 1 mL de medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato), para obtener una concentración de 150 mM de NaCl en el medio de cultivo, se mantuvo bajo esta condición de estrés osmótico por 1 día,. Después se recuperó la biomasa por centrifugación, se resuspendió en medio TAP_{pH 9.5} ó TAP_{pH10.5} (según el pH evaluado), y se mantuvo bajo esta condición de estrés por pH alcalino (9.5 ó 10.5) por 2 días.

Tratamiento Control.- al cultivo de 7 días (*C. reinhardtii*) ó 10 días (*C. saccharophila*) se adicionaron 10 mL de medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato), se mantuvo por 1 día. Posteriormente se recuperó la biomasa por centrifugación, se resuspendió en medio TAP, y se mantuvo por 2 ó 7 días dependiendo si se trataba de un control para el tratamiento de pH o de N.

Al finalizar los tratamientos se tomó una alícuota del cultivo para la determinación de la concentración celular. En seguida se recuperó la biomasa por centrifugación, se liofilizó y se realizó la determinación de la acumulación de la biomasa por peso. Posteriormente se realizó la extracción de lípidos, se transesterificaron los extractos obtenidos y finalmente se realizó el análisis del perfil de los ésteres metílicos obtenidos bajo estas condiciones de cultivo, como se describe más adelante.

2.1.1 Desarrollo experimental

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo de la siguiente forma (Figura 2.2):

- Se estableció el cultivo de las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella saccharophila* en medio semi-sólido; para su mantenimiento en medio TAP, realizando resiembras cada mes.
- Se prepararon pre-cultivos de cada una de las microalgas, los cuales sirvieron para inocular los cultivos experimentales.

- Se inocularon $10,000 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ provenientes de los pre-cultivos, en matraces de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio de cultivo
- Se realizaron los experimentos de estrés bajo las condiciones previamente señaladas (Figura 2.1).
- Se midió la concentración celular y se recuperó la biomasa obtenida por centrifugación.
- La biomasa obtenida se liofilizó y se almacenó en un desecador hasta su uso.

Se realizó la extracción de lípidos con cloroformo-metanol 2:1 v/v [30].

- El extracto crudo fue transesterificado, y posteriormente analizado por cromatografía de gases.
- Se analizó el perfil de ésteres metílicos obtenidos.
- Se realizaron los cálculos de rendimiento de los ésteres metílicos.
- Se realizó el análisis estadístico con los datos obtenidos del cálculo de los rendimientos.

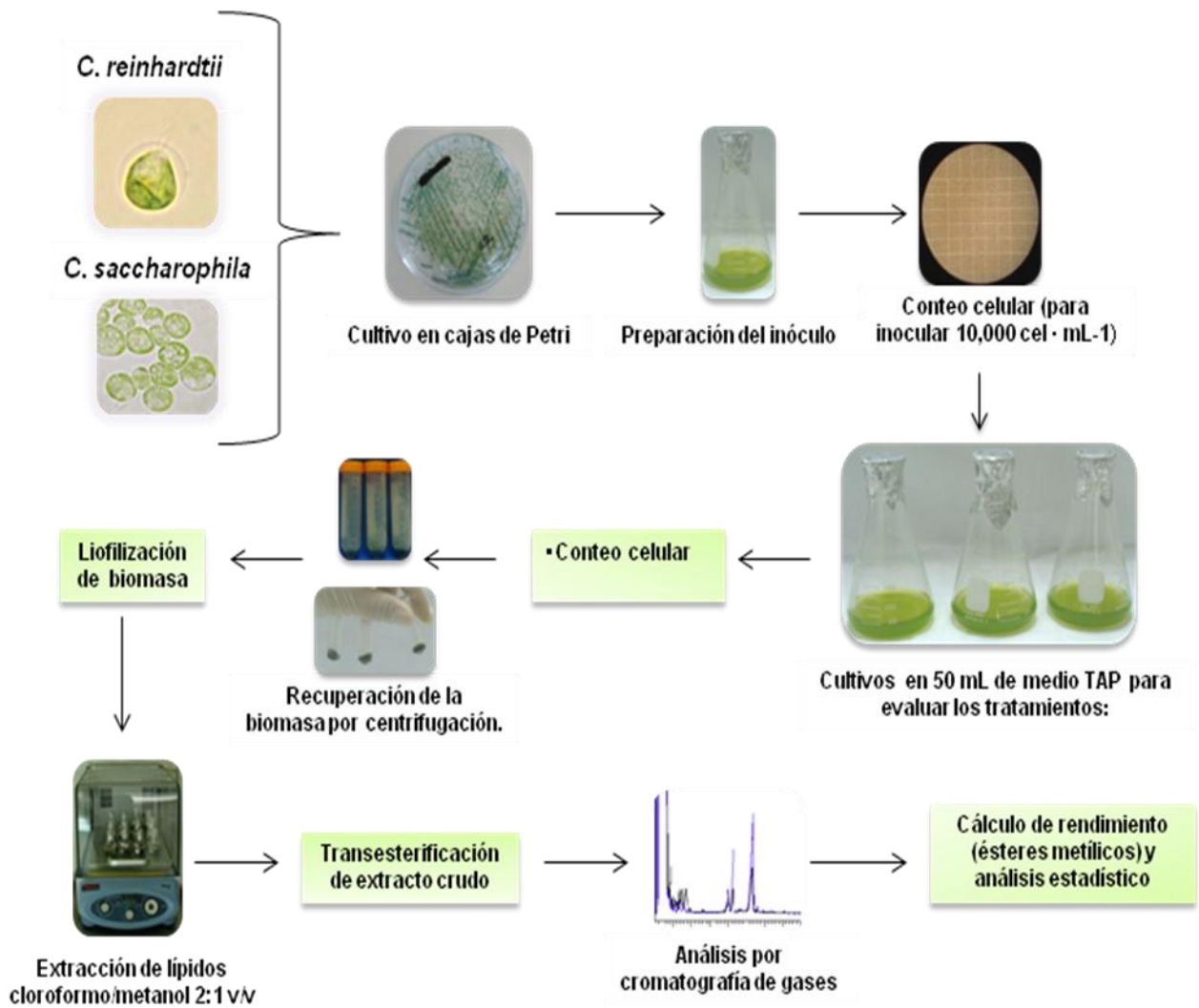


Figura 2.2. Desarrollo experimental.

2.2 Cepas y cultivo de microalgas

Se utilizó la cepa silvestre de *C. reinhardtii* 137c (mt+), proporcionada gentilmente por la Dra. Elizabeth H. Harris del Centro de Chlamydomonas (www.chlamy.org). La cepa de *Chlorella saccharophila* fue proporcionada gentilmente por la Q.F.B. Silvia J. López Adrián de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), y pertenece a la colección de microalgas de agua dulce del Herbario “Alfredo Barrera Marín” (clave UADY-PRIORI-014-FMVZ-04).

2.2.1 Medio de cultivo

El medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP) [60] fue preparado según la formulación que se presenta en el apéndice A (Tabla A.1 y A.2), y se ajustó a pH 7 (utilizando HCl y KOH 1 M). Se esterilizó en autoclave a 1.5 atm por 20 minutos. El medio TAP semisólido se preparó agregando 15 g/L de agar-agar (marca Merck) y se utilizó para mantener las cepas de microalgas realizando resiembras cada 30 días.

Para la microalga *Chlorella saccharophila*, cuatro medios de cultivo fueron preparados para determinar el más adecuado: medio TAP, medio Bold basal (BB) modificado de Nichols [61] (se sustituyó el MoO_3 por $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, y el $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ fue sustituido por $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$), medio Fitzgerald modificado de Widjaja *et al.*, [30] (se sustituyó el EDTA_{tri}-Na por el EDTA sal de sodio férrico, y KI por KBr; no se agregaron $\text{CdCl}_2\cdot (5/2) \text{H}_2\text{O}$ y $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\cdot 24\text{H}_2\text{O}$), y medio GB11 modificado de Stanier *et al.*, [62] (se cambió el $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ por K_2HPO_4 y $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot \text{NH}_4\text{OH}$ por $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$). composiciones de los medios se muestran en el Apéndice A (tablas A.1, A.3, A.5, A.7 y las soluciones stock en las tablas A.2, A.4, A.6 y A.8), Todos los medios se ajustaron a pH 7 y fueron esterilizados en autoclave a 1.5 atm por 20 minutos.

2.2.1.1 Medio de cultivo con pH 9.5 (TAP pH 9.5) ó pH 10.5 (TAP pH 10.5)

El medio TAP se preparó como se indica en el apéndice A (Tabla A.1 y soluciones stock Tabla A.2) posteriormente se ajustó el pH (pH 9.5 ó pH 10.5 según fue el caso) utilizando soluciones de HCl y KOH (1 M) y finalmente se esterilizó por filtración al vacío utilizando para ello un filtro MILLIPORE HA de 0.45 μm (los materiales utilizados para la esterilización fueron previamente esterilizados en autoclave a 1.5 atm por 20 min); el proceso se realizó en una campana de flujo laminar.

2.2.1.2 Medio de cultivo con disminución de la fuente de Nitrógeno (TAP-[N])

Este medio se preparó eliminando una de las fuentes de nitrógeno del medio: NH_4Cl , que se encuentra en la solución stock A (Tabla A.2), y que corresponde a una cantidad de N_2 de $0.1046119 \text{ g L}^{-1}$. La solución stock de metales traza de Hutner contiene MoO_7O_2 (NH_4) $_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, por lo que también se considera fuente de nitrógeno (0.011 mg L^{-1} en el medio de cultivo) y no se retiró del medio.

2.2.2. Solución de NaCl

Se preparó una solución 1 M de NaCl en agua, la que se esterilizó en una autoclave a 1.5 atm por 20 min, y se añadió 9 mL de la solución 1 M de NaCl diluidos en 1 mL de medio TAP a los cultivos de las microalgas, para obtener una concentración de 1.5 M en el medio de cultivo.

2.2.3 Cultivo de las microalgas

El mantenimiento de las microalgas se realizó en medio TAP semisólido con resiembras cada 30 días, en un cuarto de cultivo a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, en fotoperiodo 16/8 h luz/obscuridad. Los cultivos en líquido se realizaron en matraces Erlenmeyer de 50 mL ó 250 mL de capacidad con 10 mL ó 50 mL de medio de cultivo, según fuera el caso. En la figura 2.3 se presenta un ejemplo de los cultivos en líquido en el agitador orbital a 140 rpm.



Figura 2.3. Cultivos de las microalgas

Para inocular los matraces experimentales, se utilizó un pre-cultivo de las microalgas. Este pre-cultivo se inició inoculando una colonia en 50 mL de volumen de medio TAP y se incubó a 25°C, en fotoperiodo de 16/8 h luz/obscuridad y en agitación a 140 rpm, por 7 días (*C. reinhardtii*) ó 10 días (*C. saccharophila*).

Para los experimentos de estrés, a cada matraz de 250 mL se le añadió un volumen de 50 mL de medio de cultivo TAP, se inocularon con 10,000 células mL⁻¹ tomados del pre-cultivo. Se incubaron a una temperatura de 25°C, con agitación a 140 rpm y en fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad, por 7 días (*C. reinhardtii*) ó 10 días (*C. saccharophila*) (Figura 2.3). Al finalizar los 7 días o 10 días de incubación, los cultivos fueron sometidos a diferentes tratamientos de estrés.

2.3 Determinación de la acumulación de biomasa

Al término de los experimentos, se determinó la acumulación de biomasa por conteo celular y peso seco.

Para realizar el conteo del número de células se tomó una alícuota de 900 µL del cultivo y se fijó añadiendo 100 µL de yoduro de lugol (Apéndice B), se agitó durante 5 minutos en un agitador orbital a 140 rpm, posteriormente se depositó la muestra fijada en una cámara de Neubauer y se observó al microscopio óptico (Figura 2.4) con el objetivo de 40X. El área central de conteo de la cámara de Neubauer contiene 25 cuadros grandes (Figura 2.4 A) y cada uno de ellos posee a su vez 16 cuadros pequeños (Figura 2.4 C); al hacer el conteo se tomaron en cuenta solamente 5 cuadros (Figura 2.4 B) y las células que se encontraban en el área comprendida entre las líneas de los lados del cuadro grande para evitar contar dos veces. Para mayor precisión se contaron dos cámaras, y con los datos obtenidos se aplicó la siguiente fórmula:

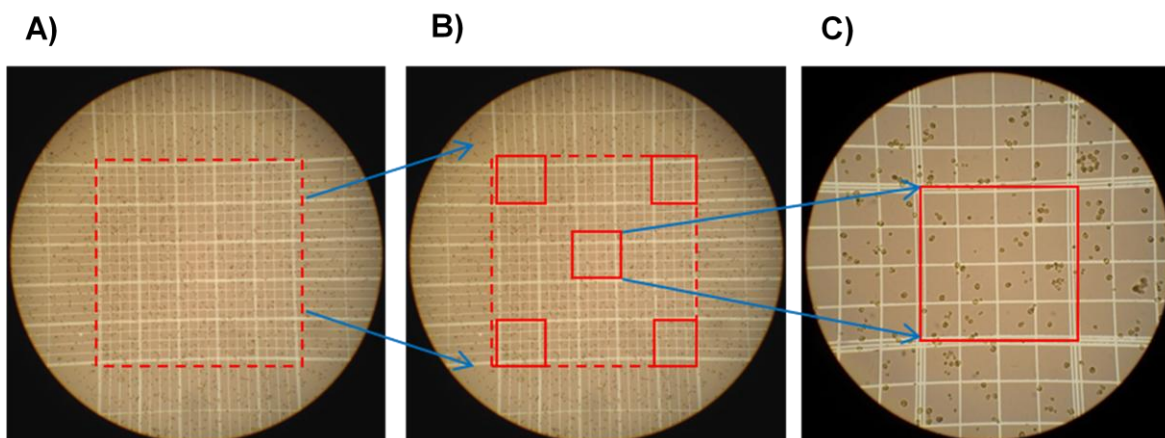


Figura 2.4. Vista desde el microscopio de la cámara de Neubauer. A) Vista desde objetivo 10X, B) Vista de los 5 cuadros en el que se cuentan células desde objetivo 10X, C) vista del cuadro del centro desde objetivo 40X.

Para la determinación del peso seco, las células se concentraron por centrifugación a 4000 rpm por 7 min a 25 °C, se retiró el sobrenadante y se concentró la pastilla en tubos tipo “ependorf” por centrifugación a 14000 rpm por 1 min. Posteriormente se congelaron en Nitrógeno líquido y se guardaron en ultracongelador a – 80 °C por 1 día. Finalmente la biomasa se liofilizó; una vez obtenida la biomasa liofilizada se realizó la determinación de la acumulación de la biomasa por peso seco usando una balanza analítica OHAUS.

2.4 Extracción de lípidos

Los lípidos contenidos en la biomasa seca de las microalgas fueron extraídos con una mezcla de cloroformo/metanol 2:1 v/v [30], utilizando 0.395 mL de solvente por mg de biomasa seca.

2.4.1 Transesterificación

Los extractos obtenidos fueron transesterificados adicionando 2 mL de n-heptano. En seguida se tomaron 1.5 mL y se le añadieron 300 μ L de una solución de metóxido sódico al 0.35% (preparado mezclando metanol e hidróxido de sodio, por 3.5 g de NaOH/ 1000mL de metanol) y 300 μ L de acetato de etilo. El tiempo de reacción al que fue sometido fue de 90 minutos con agitación moderada, y temperatura de 45 °C a baño

María, regulado por una placa de agitación con calentamiento. Los 0.5 mL restantes del extracto con n-heptano se guardaron como una referencia.

2.4.2 Cromatografía de gases

Los ésteres metílicos contenidos en los extractos transesterificados fueron cuantificados por cromatografía de gases, para lo cual se utilizó una columna DB5-HT (15m x 0.32mm ID x 0.1 μm de espesor de película) con las siguientes condiciones: flujo de gas acarreador N_2 : 3 mL/min, temperatura de inyector y detector FID: 380°C, la temperatura del horno fue por rampas, 50°C inicial, luego una rampa de 15 °C/min hasta 180°C, una segunda rampa de 7°C/min hasta 230°C y una tercera de 30°C/min hasta 380°C y se mantiene esta temperatura por 10 min. El volumen de inyección de la muestra fue 1 μL . Se utilizaron los estándares internos éster metílico hexadecanoico y éster metílico octadecenoico, con los cuales se realizaron las curvas de calibración.

2.4.3 Cromatografía de gases masas

Los ésteres metílicos contenidos en los extractos transesterificados fueron determinados mediante cromatografía de gases masas, para lo cual se utilizó una columna Agilent DB-5 (30 m x 0.32 mm ID x 0.5 μm de espesor de película) con las siguientes condiciones: flujo de gas acarreador He: 1.5 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura del horno fue por rampas: primera 120 °C por 1 min, segunda 15 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 180 °C, tercera 7 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 230 °C y la última rampa 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 300 °C y se mantiene esta temperatura por 60 min. Voltaje de ionización 70 eV y el volumen de inyección de la muestra fue 1 μL .

2.4.4 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos del cálculo de los rendimientos (concentración celular, biomasa seca, extracto crudo, ésteres metílicos), se realizó una prueba estadística ANOVA (análisis de varianza) utilizando el programa Statgraphics Plus para reconocer las posibles diferencias en los tratamientos.

Capítulo 3 Análisis del perfil de ésteres metílicos en el cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* bajo condiciones de estrés por disminución de la fuente de nitrógeno, pH alcalino y estrés osmótico por NaCl.

3.1 Introducción

Las microalgas verdes se perfilan como una de las mejores alternativas para la producción de biodiesel, debido a su capacidad de sintetizar lípidos, principalmente en forma de triglicéridos y a que pueden acumular grandes cantidades de biomasa en un tiempo corto ya que pueden llegar a duplicar su biomasa en tan sólo 24 h [3], a diferencia de las plantas superiores, como por ejemplo *Jatropha curcas* que produce frutos, de los que se obtienen las semillas de las que se extraen los lípidos, a partir del segundo año de su plantación, y la producción de estos frutos se estabiliza a partir del cuarto o quinto año [64]. *Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga verde considerada un modelo de estudio experimental en biología celular y molecular, debido a su capacidad de crecer heterotróficamente con acetato como su única fuente de carbono, lo cual ha hecho a esta especie útil para la investigación de la biogénesis y funciones del cloroplasto, y a que sus ciclos vegetativos y sexuales son simples y fácilmente manipulables en el laboratorio. Esto la convierte en una herramienta poderosa para el análisis genético de la fotosíntesis, así como otras muchas funciones celulares, y además sus genomas tanto del núcleo (No. de accesoión del GenBank NW_001843987) como del cloroplasto (No. de accesoión del GenBank BK000554) han sido secuenciados en su totalidad [49]. Por otra parte, esta microalga produce ácidos grasos, de los que se forman los triglicéridos característicos de plantas superiores que son utilizadas como materia prima para la elaboración de biodiesel [64] y actualmente cuenta con numerosas técnicas y herramientas para su modificación genética. Por ello, el estudio de la producción de sus lípidos resulta relevante, ya que de confirmarse que tiene el potencial como materia prima para la producción de biodiesel, probablemente se le pudiese realizar algún tipo de modificación genética para incrementar su producción de triglicéridos.

Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre lípidos, con microalgas del género *Chlamydomonas* han sido enfocados a la identificación y cuantificación de los ésteres

metílicos obtenidos a partir de su cultivo y no a los factores que pueden incrementar la producción de triglicéridos. [51].

Por otro lado, en diferentes estudios se ha observado que la acumulación de lípidos en las microalgas puede incrementarse bajo ciertas condiciones de cultivo, entre las que se encuentran estrés por disminución de nutrientes [33, 44, 45, 46] y pH alcalino [47]. En otros estudios [40, 41, 43, y 64] se observó que el estrés osmótico puede producir un aumento en la producción del glicerol y debido a que éste es un precursor de la síntesis de triglicéridos [6], es posible que la condición de estrés osmótico en los cultivos produzca un aumento del glicerol que posteriormente resulte en un aumento de triglicéridos al ser sometidos a estrés por disminución de la fuente de N ó a estrés por pH alcalino.

Por lo tanto, en este capítulo se realizó el análisis de los ésteres metílicos obtenidos del cultivo de la microalga *C. reinhardtii* bajo condiciones de estrés tales como disminución de la fuente de nitrógeno y estrés por pH alcalino (10.5), así como la combinación de estos tipos de estrés con estrés osmótico por NaCl.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Curva de crecimiento

Para determinar el tiempo óptimo de cultivo de *C. reinhardtii* se realizó una curva de crecimiento, para lo cual se llevó a cabo un cultivo en 50 mL de medio TAP por triplicado durante 14 días, se muestreó cada segundo día y se determinó la concentración celular siguiendo la metodología descrita en el capítulo 2.

3.2.2 Experimentos de estrés

Para cumplir con el primer objetivo de este trabajo, se diseñaron dos experimentos para *C. reinhardtii*: el experimento 1 se diseñó con el fin de analizar el perfil de ésteres metílicos de esta microalga bajo estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos (Figura 3.1). El

experimento 2 se diseñó para analizar de nuevo el perfil de ésteres metílicos de *C. reinhardtii*, pero bajo estrés por pH alcalino 10.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos (Figura 3.2). Posteriormente estos experimentos se repitieron para verificar que los resultados fueran replicables.

Los tratamientos de estrés y el control se realizaron por triplicado (figuras 3.1 y 3.2). Se utilizó el medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP) [60], con las modificaciones pertinentes para los experimentos de estrés, resultando los medios TAP_{-[N]}, y TAP_{pH 10.5}, los cuales se prepararon como se indica en el capítulo 2. Para los experimentos de estrés osmótico se utilizó una solución 1 M de NaCl.

El pre-cultivo se inició con una colonia de *C. reinhardtii* 137c (mt+) en 50 mL de medio TAP por siete días hasta alcanzar el final de la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 7.5×10^6 cel·mL⁻¹). Se tomó una alícuota de este pre-cultivo para inocular 50 mL de medio TAP con $10,000$ cel·mL⁻¹, y se mantuvo en cultivo por 7 días, al final de los cuales se aplicó el tratamiento de estrés correspondiente. Se probaron cinco tratamientos de estrés, como se describe en el capítulo 2: disminución de la fuente de nitrógeno (N), estrés por pH alcalino (pH10.5), estrés osmótico por cloruro de sodio (NaCl), la combinación de estrés osmótico por disminución de la fuente de nitrógeno (NaCl/N), la combinación de estrés osmótico con estrés por pH alcalino (NaCl/pH10.5).

Al finalizar los tratamientos se tomó una alícuota de 900 μ L para la determinación de la concentración celular, se recuperó la biomasa por centrifugación a 4000 rpm por 7 min a 25 °C, se retiró el sobrenadante y se concentró la pastilla en tubos tipo "ependorf" por centrifugación a 14000 rpm por 1 min, seguidamente se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron en un ultracongelador a - 80 °C por 1 día, finalmente la biomasa se liofilizó. Una vez obtenida la biomasa liofilizada se realizó la determinación de la acumulación de la biomasa por peso seco como se describió en el capítulo 2.

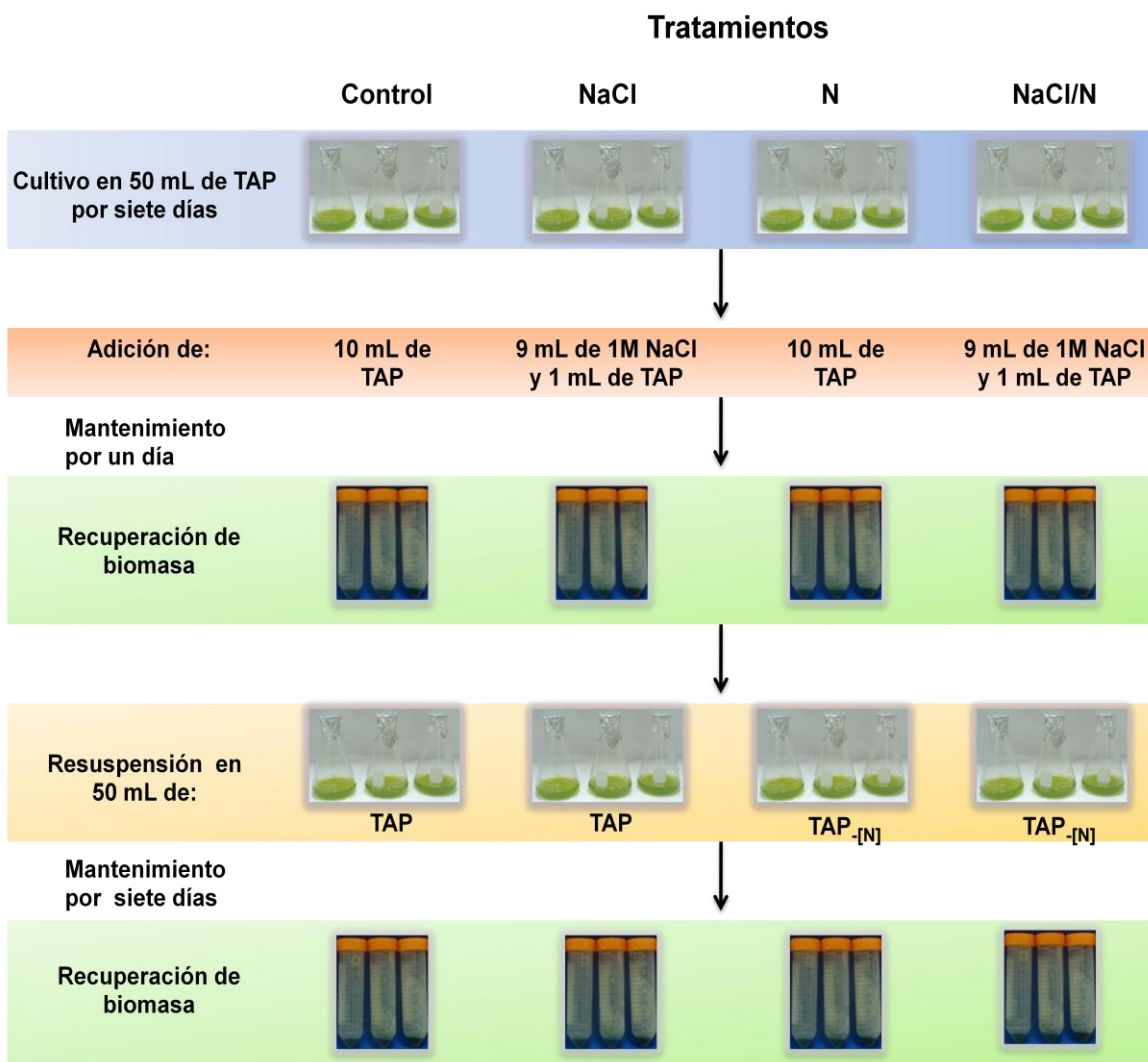


Figura 3.1. Diseño del experimento 1. Análisis del perfil de ésteres metílicos bajo estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos (n=3).

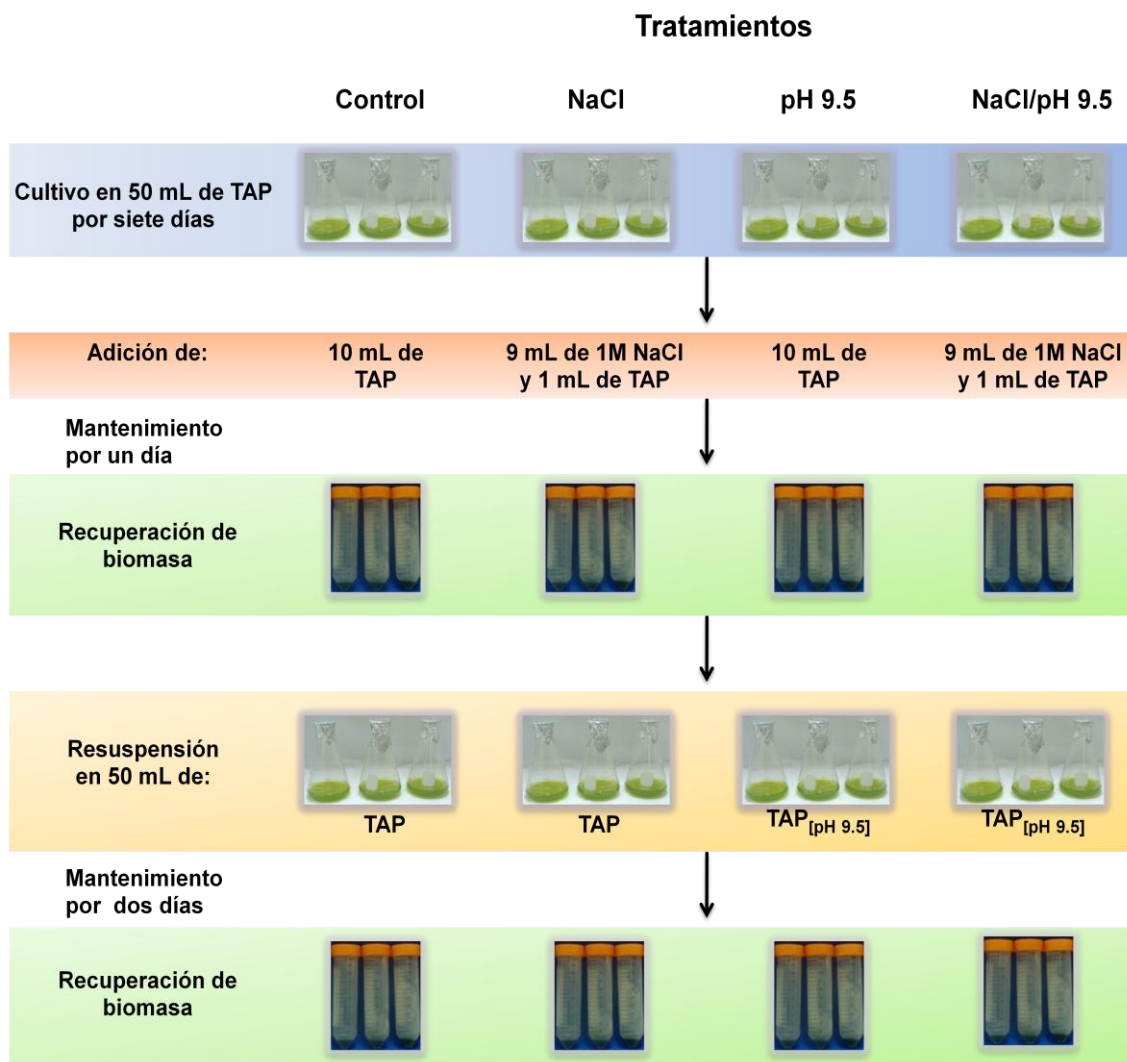


Figura 3.2. Diseño del experimento 2. Análisis del perfil de ésteres metílicos bajo estrés por pH alcalino 10.5, estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos (n=3).

3.2.3 Análisis de ésteres metílicos.

Para la extracción de los lípidos, se obtuvo el peso seco de la biomasa y se calculó la relación de solvente para la extracción de lípidos (0.394 mL de solvente cloroformo/metanol 2:1 v/v por cada miligramo de biomasa seca). La biomasa seca fue transferida a un matraz de 50 mL y con la ayuda de una espátula se deshizo la pastilla, posteriormente se añadió la cantidad de solvente necesaria para la extracción de lípidos, se incubó en una incubadora a 38 °C con agitación a 150 rpm por 3 h. Después de este tiempo la mezcla de extracción (solvente más la biomasa) fue transferida a un tubo Falcon

y se dejó precipitar la biomasa por media hora, seguidamente con la ayuda de una micropipeta se transfirió el sobrenadante a un vial. La biomasa residual se dejó secar, y se le realizó una segunda extracción usando la misma cantidad de solvente utilizada anteriormente. El sobrenadante y la biomasa resultante de las dos extracciones se dejaron secar en una campana de extracción. Una vez que el solvente se evaporó del sobrenadante de la muestra, lo que quedó se consideró como el extracto crudo obtenido y fue pesado. También se obtuvo el peso de la biomasa residual resultante del proceso de extracción.

El extracto crudo se utilizó para la reacción de transesterificación, y se analizó por cromatografía de gases para determinar la concentración de ésteres metílicos, como se indicó en el capítulo 2.

Por otra parte, la muestra transesterificada correspondiente al control del experimento de disminución de la fuente de nitrógeno fue analizada por cromatografía de gases masas (GC-MS) para identificar los ésteres metílicos presentes, como se describió en el capítulo 2.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Curva de Crecimiento

La figura 3.3 muestra la curva de crecimiento del cultivo de *C. reinhardtii* en la que se aprecia el tiempo en el cual se acumula la mayor cantidad de biomasa.

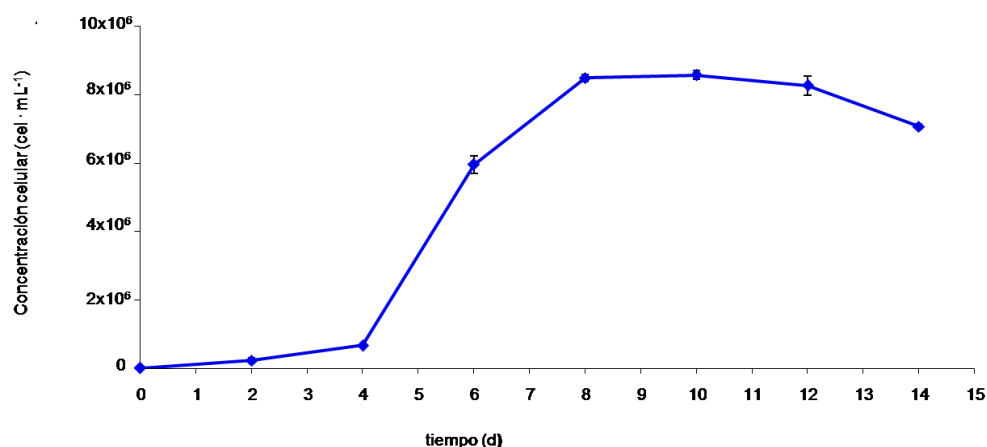


Figura 3.3. Curva de crecimiento de *C. reinhardtii*

Se puede observar que la mayor concentración celular (8.4×10^6 cel mL⁻¹), se obtuvo al día 8 de cultivo, a partir del cual se observó la etapa estacionaria y finalmente después del día 12 de cultivo se observó la etapa de decaimiento. Este resultado concuerda con reportes previos que mencionan que la máxima concentración celular se observa alrededor del día 7 de cultivo, a partir del cual generalmente comienza la fase estacionaria. En este trabajo se escogió el día 7 para aplicar la condición de estrés respectiva, ya que corresponde al día antes de que comience la fase estacionaria, por lo que se asume que debe haber más biomasa. Además permite que las células soporten los tratamientos de estrés al que son sometidos.

En este experimento, la concentración celular obtenida, es menor a la reportada por Harris [49], quien menciona que bajo condiciones óptimas de laboratorio, con suficiente luz, se podría alcanzar una concentración celular de hasta 2×10^7 cel·mL⁻¹, sin embargo es mayor que lo indicado por Trémolières [50] quien obtuvo una concentración celular de esta microalga de aproximadamente 1 o 2×10^6 cel mL⁻¹ ó lo indicado por Hema *et al.* [67] quienes reportan una concentración celular al día 7 de cultivo de aproximadamente 4×10^6 cel mL⁻¹. Esta diferencia de concentración celular puede deberse a las condiciones de cultivo utilizadas, ya que por ejemplo, en el estudio realizado por Hema *et al.* [67] los cultivos se iniciaron a partir de una sola colonia, se mantuvieron incubados a 23 °C con agitación a 80 rpm con luz continua, y Harris [49] utilizó fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad para el cultivo, mientras que en este estudio los cultivos se iniciaron con $10,000$ cel·mL⁻¹, se incubaron a 25° con agitación a 140 rpm en fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

3.3.2. Identificación de ésteres metílicos por cromatografía de gases masas (GC/MS)

Los ésteres metílicos presentes en el extracto transesterificado de una muestra control de *C. reinhardtii* fueron identificados por cromatografía de gases masas (GC/MS). Los ésteres metílicos identificados fueron: éster metílico del ácido hexadecanoico (C-16), éster metílico del ácido octadecanoico (C-18), éster metílico del ácido octadecenoico (C-18:1cis y C-18:1 trans) y éster metílico del ácido octadecadienoico (C-18:2). En las revisiones realizadas no se ha encontrado datos sobre el perfil de ésteres metílicos para *C.*

reinhardtii específicamente, pero en el estudio de Morowvat *et al.* [51] con una cepa de *Chlamydomonas sp.* MCCS 026 aislada del suelo de cultivos de arroz en Irán, se obtuvieron los ésteres metílicos de ácidos grasos siguientes: éster metílico del ácido nonanoico (C-9), éster metílico del ácido dodecanoico (C-12), éster metílico del ácido tetradecanoico (C-14), éster metílico del ácido hexadecanoico (C-16), éster metílico del ácido pentadecanoico (C-15), éster metílico del ácido eicosanoico (C-20), éster metílico del ácido o heneicosanoico (C-20:5), éster metílico del ácido docosanoico (C-22), éster metílico del ácido tetracosanoico (C-24). Esta diferencia puede deberse a la microalga utilizada, ya que ellos utilizaron la microalga *Chlamydomonas sp.* MCCS 026 y en este trabajo se utiliza específicamente la microalga *C. reinhardtii*, por otro lado ellos utilizan el medio de cultivo BG11 y CO₂ limitado para el cultivo, y en este trabajo se utiliza el medio TAP y otras condiciones de cultivo, tales como los diferentes tratamientos y acetato como fuente de carbono.

3.3.3 Efecto del estrés por disminución de la fuente de nitrógeno, y la combinación con estrés osmótico por NaCl en el cultivo de *C. reinhardtii*.

3.3.3.1. Efecto en la acumulación de biomasa.

En la figura 3.4, se pueden observar los cultivos sometidos a estrés con los tratamientos de NaCl, N y NaCl/N, así como el control. Los cultivos con tratamiento de N y NaCl/N, en los que se disminuyó la fuente de nitrógeno, visualmente presentaron una coloración menos intensa que el control. Por su parte, los cultivos con tratamiento de NaCl en el que la fuente de nitrógeno se mantuvo intacta, presentaron una coloración similar a la del control, lo que sugiere que la diferencia de coloración puede deberse al estrés por deficiencia de nitrógeno. En la figura 3.4 se presentan imágenes de las células de *C. reinhardtii* al microscopio óptico a 40X, en las que se puede observar que las células de estos cultivos presentan un tamaño similar.

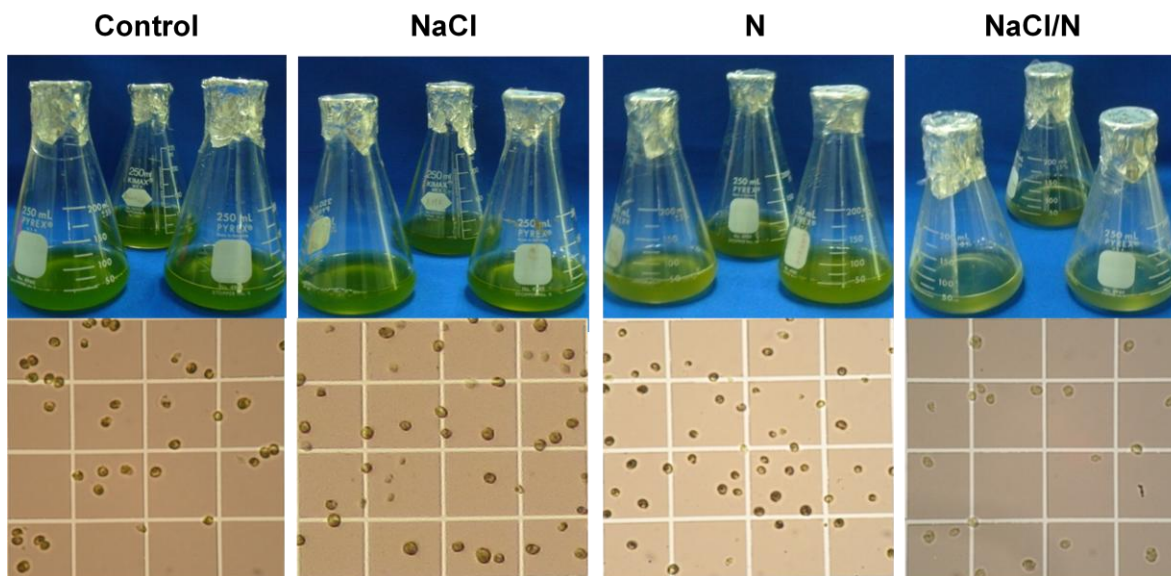


Figura 3.4. Cultivos de *C. reinhardtii*, en matraces con 50 mL de TAP, y células de estos cultivos observadas al microscopio óptico a 40X al final del experimento (día 15), con los diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno.

En la figura 3.5 A, se presenta la concentración celular de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control, en el que se observa que el tratamiento de NaCl presentó un número de células de 9.34×10^6 cel mL⁻¹. Este valor es ligeramente mayor que el obtenido por el control, 8.9×10^6 cel mL⁻¹, aunque no fueron estadísticamente diferentes. Los tratamientos de N y NaCl/N presentaron una disminución significativa en su concentración celular con respecto a los otros tratamientos, con 5.99×10^6 y 7.39×10^6 cel mL⁻¹ respectivamente. Esto sugiere que al igual que la disminución de la coloración en los cultivos, esta disminución de células puede deberse al estrés por deficiencia de nitrógeno. En estudios previos se ha reportado que esta disminución de nitrógeno provoca cambios fisiológicos en las células reduciendo su eficiencia fotosintética para recolectar la luz, la transducción de energía y la fijación de CO₂. Esto ocasiona una disminución de la concentración de la clorofila a, un aumento en la concentración de los carotenoides, así como una disminución del número de células presentes en los cultivos [44, 45, 46, 68]. Por otra parte en los cultivos con tratamiento de NaCl en los que no se observó una disminución de la coloración, ni una disminución del número de células, quizá la fotosíntesis y crecimiento celular se inhibieron momentáneamente, pero como después del estrés osmótico, las células fueron resuspendidas en medio TAP sin ninguna modificación, las células posiblemente se recuperaron del estrés. León y Galván [65],

mencionan que la microalga *C. reinhardtii* presenta una inhibición del crecimiento celular y de la fotosíntesis en condiciones de estrés osmótico, como también lo mencionan otros autores [40, 41, 42] cuando se utilizan concentraciones de NaCl de 100 hasta 200mM, pero después de que el glicerol, metabolito que actúa como un osmorregulador, es excretado al medio por la microalga, las células se recuperan y dejan de presentar inhibición del crecimiento celular y de la fotosíntesis.

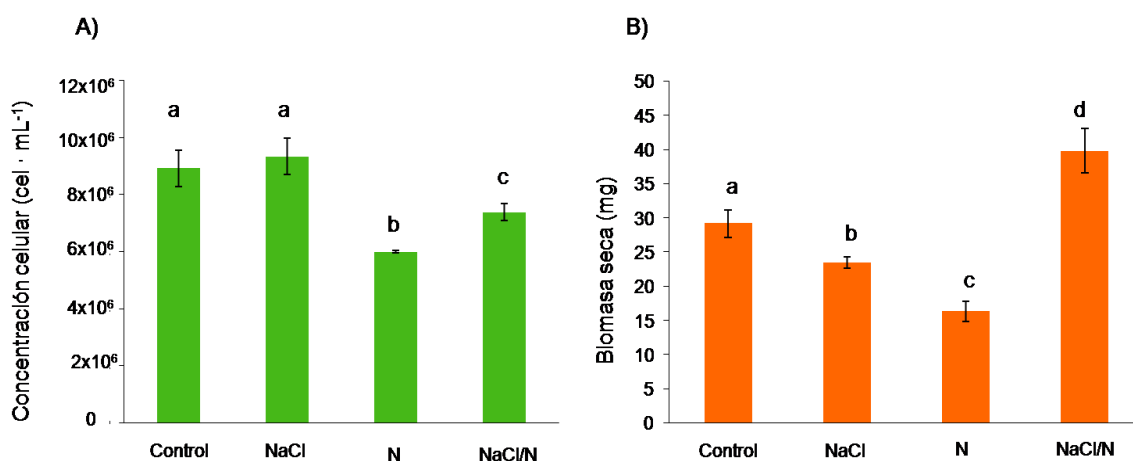


Figura 3.5. Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

En la figura 3.5 B, se presenta la acumulación de la biomasa seca de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control. Se puede observar que los cultivos con tratamiento de NaCl presentaron una acumulación de biomasa seca de 23.42 mg, la cual fue menor que en el control, en el que se acumularon 29.1 mg, y aunque la concentración celular indica que entre los cultivos con tratamiento NaCl y control hay un número de células estadísticamente igual, las células de los cultivos con tratamiento de NaCl eran menos pesadas, y esto quizá se deba a que acumularon menos metabolitos. El tratamiento de N presentó la mayor disminución de biomasa seca acumulando 16.27 mg, lo cual puede deberse a que hay un menor número de células en los cultivos, mientras que por el contrario el tratamiento de NaCl/N presentó un aumento de la biomasa seca, respecto a los otros tratamientos, acumulando 39.76 mg, esto quizá se deba a que acumularon una mayor cantidad de metabolitos.

3.3.3.2 Efecto en la acumulación de ésteres metílicos.

Como resultado de la extracción con solventes [33] se obtuvieron lípidos y otros compuestos como pigmentos presentes en las células y aunque algunos autores que han utilizado la mezcla de solventes cloroformo/metanol mencionan como lípido total obtenido al producto de la extracción realizada con este sistema de solventes [30,33], en este trabajo se optó por denominarlo como extracto crudo. En la figura 3.6 A, se presentan los valores promedio del extracto crudo obtenido de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control. Los cultivos sometidos a tratamiento de NaCl produjeron una cantidad de extracto crudo de 12.8 mg, este valor no es estadísticamente diferente a los 16.7 mg de extracto crudo obtenidos de los cultivos con el tratamiento control. Aunque la figura 3.5 B indica que los cultivos con el tratamiento control acumularon una mayor biomasa en comparación a los cultivos con tratamiento de NaCl, la figura 3.6 A indica que para ambos tratamientos la cantidad de extracto crudo es estadísticamente igual. Por otro lado, los cultivos con tratamiento de N presentaron la menor cantidad de extracto crudo, 6.26 mg en promedio, lo cual coincide con el hecho de que estos cultivos presentaron la menor acumulación de biomasa seca (Figura 3.5 B), mientras que los cultivos con tratamiento de NaCl/N presentaron 7.26 mg de extracto crudo, provenientes de una mayor cantidad de biomasa seca (Figura 3.5 B) lo que indica que la cantidad de extraíbles presentes en las células era menor. En la figura 3.6 B, se presenta el porcentaje de extracto crudo (con respecto a la biomasa seca), de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos, un 56% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento control, un 54.55% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de NaCl, un 37.54% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de N y un 18.25% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de NaCl/N. Entre los porcentajes de extracto crudo obtenidos de los cultivos Control, NaCl y N no hay una diferencia estadísticamente significativa, mientras que el porcentaje de extracto de NaCl/N es estadísticamente menor a lo obtenido en los otros tratamientos.

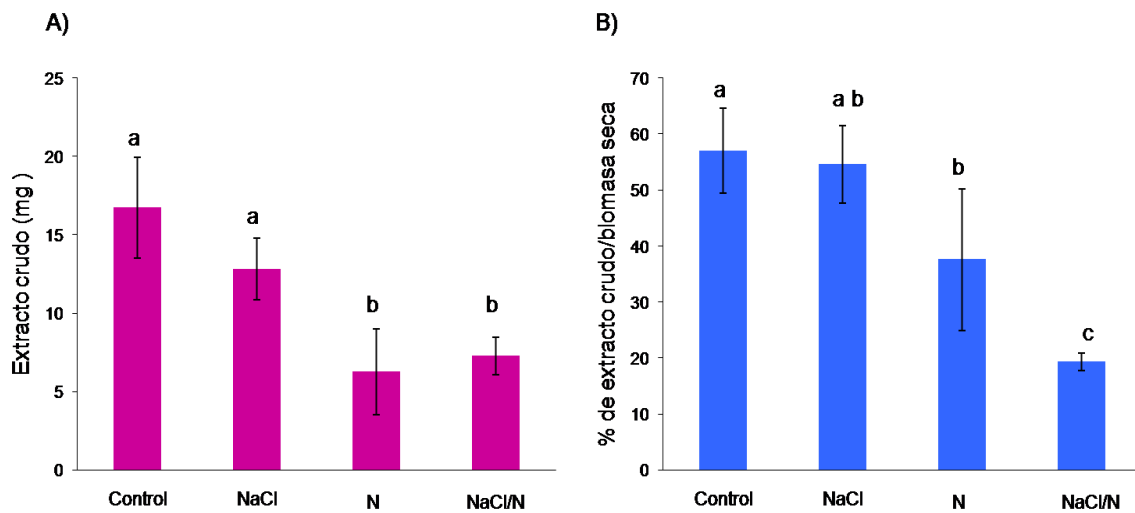


Figura 3.6. Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

Los extractos crudos de todas las muestras fueron transesterificados y analizados por cromatografía de gases (GC) como se describió previamente, y se calculó el porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto y a la biomasa seca, (Tabla 3.1 y Figura 3.7). El tratamiento de N presentó una mayor acumulación de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo y a la biomasa seca. Con respecto al extracto crudo, se obtuvieron porcentajes de éster metílico del ácido hexadecanoico de 14.07%, éster metílico del ácido octadecanoico 0.72%, éster metílico del ácido octadecenoico (cis) 19.64%, éster metílico del ácido octadecenoico (trans) 0% y éster metílico del ácido octadecadienoico 7.83%. Los porcentajes con respecto a la biomasa seca fueron: éster metílico del ácido hexadecanoico de 4.77%, éster metílico del ácido octadecanoico 0.30%, éster metílico del ácido octadecenoico (cis) 7.25%, éster metílico del ácido octadecenoico (trans) 0% y éster metílico del ácido octadecadienoico 2.67%. El tratamiento de NaCl, al igual que los demás tratamientos, presentó la mayor cantidad de los metil ésteres en comparación con el control, sin embargo es menor al presentado por los tratamientos de N y NaCl/N (Tabla 3.1 y Figura 3.7). Con el tratamiento de NaCl no se observó la presencia del éster metílico del ácido octadecanoico (C-18:0), mientras que con los tratamientos de N y NaCl/N no se observó la presencia del éster metílico del ácido octadecenoico (C-18:1trans). Por otra parte en la tabla 3.1 y la figura 3.7, gráficas C y D, se puede observar el porcentaje total

de ésteres metílicos (suma de los porcentajes individuales de los ésteres metílicos) en relación al extracto crudo y a la biomasa seca, respectivamente; con lo que se tiene que con el tratamiento de estrés por N se obtuvo una mayor cantidad de ésteres metílicos 42.28% con respecto al extracto crudo y 15% con respecto a la biomasa seca. Sin embargo, con respecto al extracto crudo, el tratamiento de N y el tratamiento de NaCl/N son estadísticamente iguales, lo que sugiere que en el extracto crudo de ambos tratamientos había una cantidad similar de triglicéridos que posterior a la transesterificación fueron convertidos a ésteres metílicos. En cambio, la biomasa seca del tratamiento NaCl/N fue mayor a la obtenida con el tratamiento de N (Figura 3.5, grafica B), y por lo tanto el porcentaje obtenido de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca resulta ser menor.

Tabla 3.1. Variación de ésteres metílicos obtenidos de *C. reinhardtii* en respuesta a estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos.

Tratamientos	Esteres metílicos (%).					Ésteres metílicos totales (%) ¹ .
	C-16	C-18	C-18:1 cis	C-18:1 trans	C-18:2	
Respecto a extracto crudo						
Control	1.64 ± 0.38	0.62 ± 0.85	2.32 ± 0.61	0.68 ± 0.18	0.80 ± 0.57	6.07 ± 0.70 a
NaCl	5.34 ± 3.2	0	6.23 ± 4.48	2.98 ± 2.04	3.16 ± 2.19	17.73 ± 2.28 b
N	14.07 ± 1.2	0.72 ± 0.28	19.64 ± 4.33	0	7.83 ± 2.50	42.28 ± 8.00 c
NaCl/N	10.91 ± 2.3	0.44 ± 0.06	20.82 ± 4.08	0	5.10 ± 0.92	37.29 ± 8.17 c
Respecto a biomasa seca						
Control	0.91 ± 0.09	0.30 ± 0.41	1.28 ± 0.16	0.37 ± 0.05	0.48 ± 0.35	3.36 ± 0.39 a
NaCl	2.76 ± 1.44	0	3.20 ± 2.03	1.54 ± 0.91	1.62 ± 0.98	9.13 ± 1.17 b
N	4.77 ± 0.45	0.30 ± 0.22	7.25 ± 4.80	0	2.67 ± 0.19	15.00 ± 2.8 c
NaCl/N	1.97 ± 0.12	0.08 ± 0.01	3.76 ± 0.19	0	0.92 ± 0.01	7.10 ± 1.48 b

¹Porcentajes ± SD de tres réplicas. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n=3).

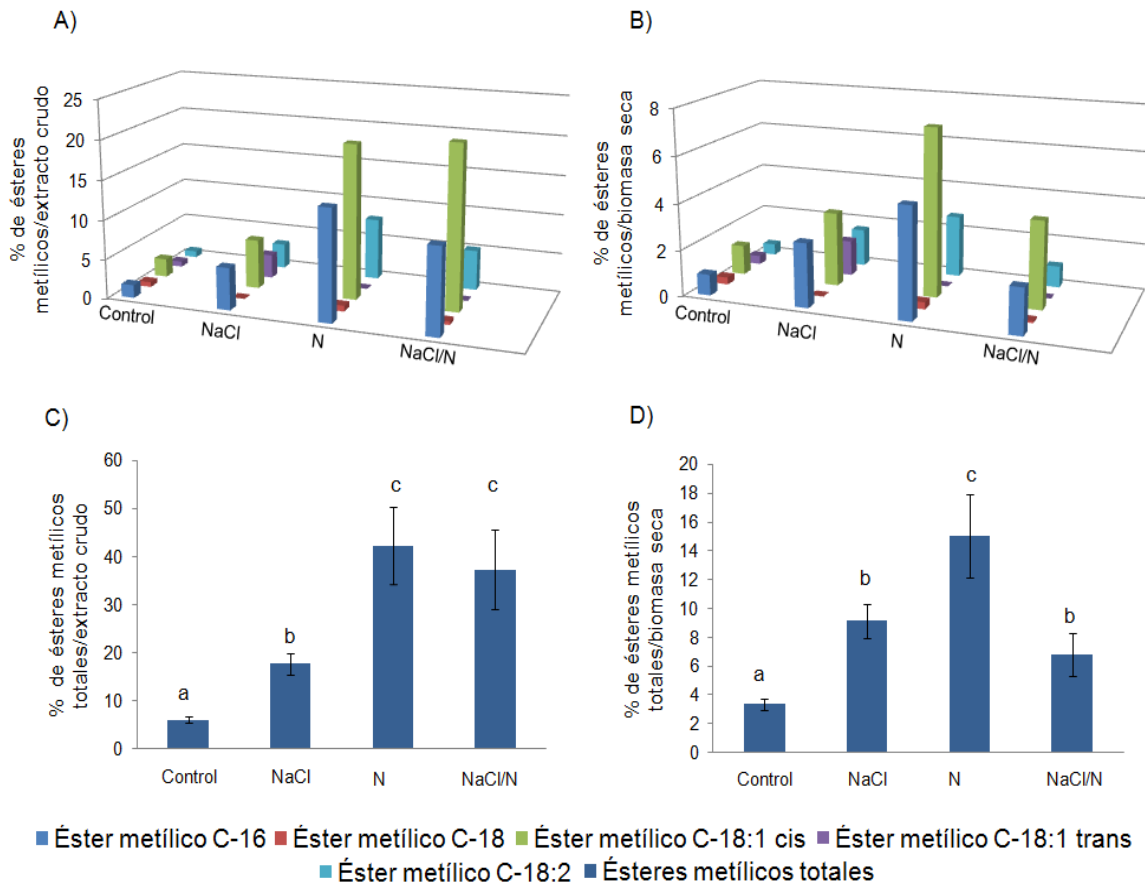


Figura 3.7. Análisis de ésteres metilílicos. A) Porcentaje de ésteres metilílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metilílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metilílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metilílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

Estos resultados son muy interesantes, ya que los primeros datos obtenidos (de peso seco, concentración celular y extracto crudo obtenido de los cultivos) indican que la mayoría de los cultivos con tratamiento de estrés, acumularon menos biomasa y en algunos casos menos extracto crudo. Sin embargo se obtuvo una mayor cantidad de ésteres metilílicos, y por tanto debe haber una mayor presencia de triglicéridos. Este resultado coincide con lo indicado por Widjaja *et al.* [30] quienes mencionan que en los cultivos de la microalga *Chlorella vulgaris* sometidos a estrés por disminución de la fuente de nitrógeno, se acumuló menos biomasa, lo cual se reflejó en una menor cantidad de lípidos. Sin embargo, someter los cultivos a este estrés resultaba mejor porque se producían más triglicéridos, lo que resulta en una mayor cantidad ésteres metilílicos. Por

otra parte en los cultivos sometidos a tratamiento de estrés por NaCl, se presentó un leve aumento de los ésteres metílicos con respecto a los cultivos control. Se puede observar que las concentraciones de los ésteres metílicos son mayores para las muestras sometidas a estrés. Esto podría deberse a que el tratamiento de estrés con NaCl produjo un aumento de glicerol, el cual es precursor de la síntesis de triglicéridos [6], lo que resultó en una mayor cantidad de ésteres metílicos en comparación con el control. Sin embargo este aumento no fue mayor al obtenido con los tratamientos de estrés por disminución de la fuente N. Por otra parte resulta importante destacar que *C. reinhardtii* produce ácidos grasos que se consideran adecuados para la producción de biodiesel C-18:1 y C-18:2 [69, 70].

3.3.3.3 Comparación del efecto de los tratamientos de estrés en la obtención de ésteres metílicos totales.

Se evaluó la cantidad de ésteres metílicos totales obtenida de cultivos de *C. reinhardtii* sometido bajo estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de ambos. Como se puede observar en la figura 3.8, la cantidad de ésteres metílicos totales que se acumularon a partir del tratamiento NaCl/N fue de 2.70 mg, el tratamiento N permitió acumular 2.64 mg, mientras que con el tratamiento NaCl se acumularon 2.26 mg. Con estos tres tratamientos se obtuvo una mayor cantidad de ésteres metílicos totales en comparación con el control. Entre los tratamientos de NaCl, N y NaCl/N no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, con los tratamientos de N y NaCl/N se obtuvieron mayores cantidades de los ésteres metílicos considerados adecuados para la producción de biodiesel de buena calidad (C-18:1 y C-18:2,) [69, 70]. Cabe señalar que con el tratamiento de N se evitó el uso de cloruro de sodio, lo cual implica un ahorro económico con respecto a los tratamientos que incluyen la adición de esta sal.

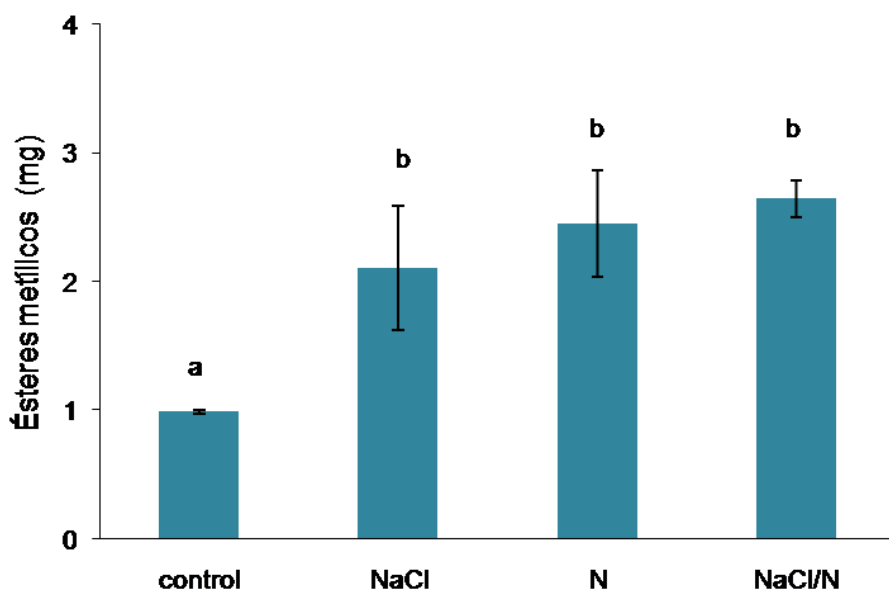


Figura 3.8 Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3).

3.3.4 Efecto del estrés por pH 10.5, y la combinación con estrés osmótico por NaCl en el cultivo de *C. reinhardtii*.

3.3.4.1. Efecto en la acumulación de biomasa.

En la figura 3.9, se pueden observar los cultivos sometidos a estrés con los tratamientos de NaCl, pH 10.5 y NaCl/pH10.5, así como el control. Los cultivos con tratamiento de pH 10.5 y NaCl/pH 10.5, visualmente presentaron una coloración menos intensa que el control. Por su parte, los cultivos con tratamiento de NaCl, en el que el pH de medio de cultivo no se cambió, visualmente presentaron una coloración similar a la de control, lo que sugiere que la diferencia puede deberse al estrés por pH alcalino (10.5). En la figura 3.8 se presentan imágenes de las células de *C. reinhardtii* al microscopio óptico a 40X, en el que se puede observar que la células de estos cultivos presentan un tamaño similar.

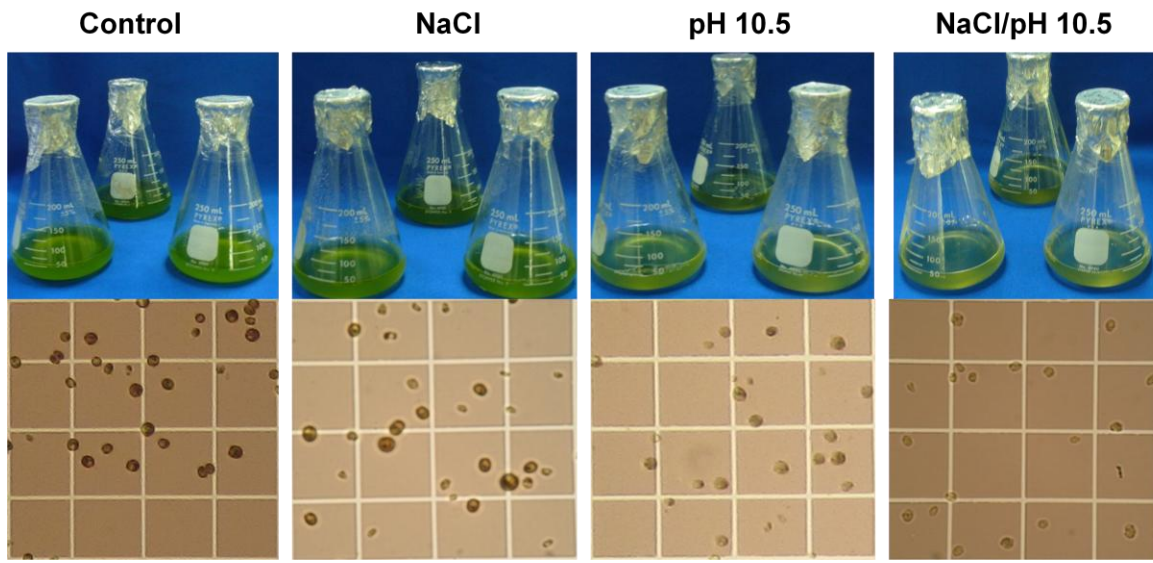


Figura 3.9. Cultivos de *C. reinhardtii*, en matraces con 50 mL de TAP, y células de estos cultivos observadas al microscopio óptico a 40X al final del experimento (día 10), con los diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino.

En la figura 3.10 A, se presenta la concentración celular de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control, en el que se observa que el tratamiento de NaCl presentó un número de células de 7.45×10^6 cel mL⁻¹, este valor es estadísticamente diferente al obtenido por el control, 9.18×10^6 cel mL⁻¹. Los tratamientos de pH 10.5 y NaCl/pH 10.5 presentaron una disminución significativa y estadísticamente diferente en su concentración celular con respecto a los otros tratamientos, con 5.40×10^6 cel mL⁻¹ y 5.88×10^6 cel mL⁻¹ respectivamente. Esto sugiere que al igual que con la disminución de la coloración en los cultivos, la disminución del número de células puede deberse al estrés por pH alcalino (10.5). Estudios previos como el de Guckert y Cooksey [47] han reportado que el aumento del pH provoca la inhibición de la actividad fotosintética y del ciclo de división celular, ocasionando una disminución del número de células presentes en los cultivos. Por otra parte en los cultivos con tratamiento de NaCl en los que no se observó una disminución de la coloración, quizá la fotosíntesis y crecimiento celular se inhibieron momentáneamente, pero como después del estrés osmótico, las células fueron resuspendidas en medio TAP, sin ninguna modificación, las células posiblemente se recuperaron del estrés. León y Galván [65], mencionan que la especie de microalga *C. reinhardtii* presenta una inhibición del crecimiento celular y de la fotosíntesis en condiciones de estrés osmótico, como también lo mencionan otros autores [40, 41, 42]

cuando se utilizan concentraciones de NaCl de 100 hasta 200mM, pero después de que el glicerol, metabolito que actúa como un osmorregulador, es excretado al medio por la microalga, las células se recuperan y dejan de presentar inhibición del crecimiento celular y de la fotosíntesis.

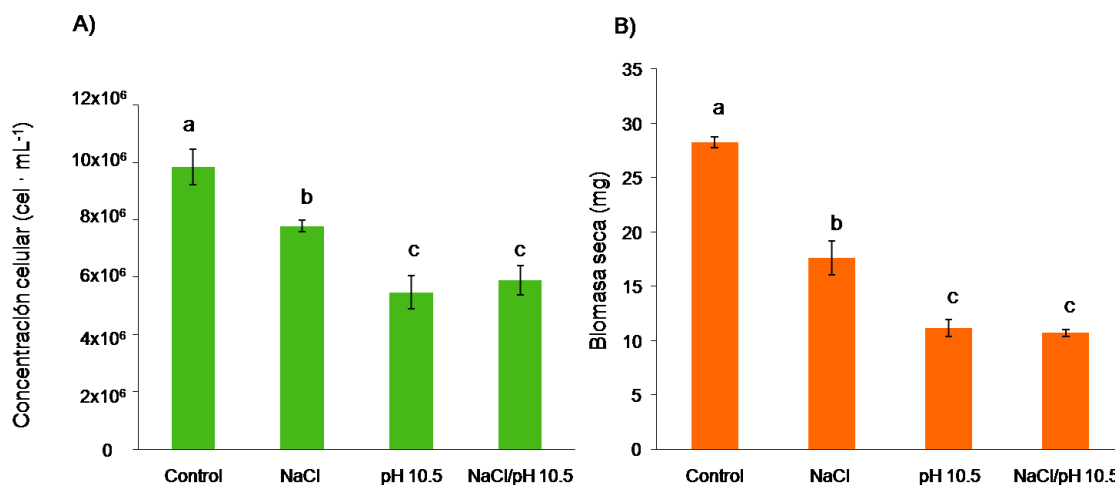


Figura 3.10. Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

En la figura 3.10 B, se presentan la acumulación de biomasa seca de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control, en el que se observa que los cultivos con tratamiento de NaCl presentaron una acumulación de biomasa seca de 17.58 mg, la cual fue menor que en el control en el que se acumularon 28.26 mg. Los tratamientos de pH 10.5 y NaCl/pH 10.5, en el que el pH de medio de cultivo se cambió, presentaron una acumulación de biomasa estadísticamente igual de 11.14 mg y 10.71 mg respectivamente, pero menor a los otros tratamientos.

3.3.4.2 Efecto en la acumulación de lípidos

En la figura 3.11 A, se presentan los valores promedio del extracto crudo obtenido de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control. Los cultivos sometidos a tratamiento de NaCl produjeron una cantidad de extracto crudo de 8.93 mg en comparación a los 16.13 mg de extracto crudo obtenidos de los cultivos control, lo cual coincide con la disminución de la biomasa seca observada en la figura 3.10 B. Por otro

lado, los cultivos con tratamiento de pH 10.5 y NaCl/pH 10.5, presentaron la menor cantidad de extracto crudo, 6.66 y 7.6 respectivamente, lo que igual coincide con que acumularon la menor cantidad de biomasa seca (figura 3.10 B). En la figura 3.11 B, se presenta el promedio del porcentaje de extracto crudo (con respecto a la biomasa seca), de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos, un 57.18% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento control, un 51.67% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de NaCl, un 60% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de pH 10.5 y un 71.21% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de NaCl/pH 10.5. Entre los porcentajes de extracto obtenidos de los cultivos Control, NaCl, pH 10.5 y NaCl/pH 10.5 no hay una diferencia significativa estadísticamente.

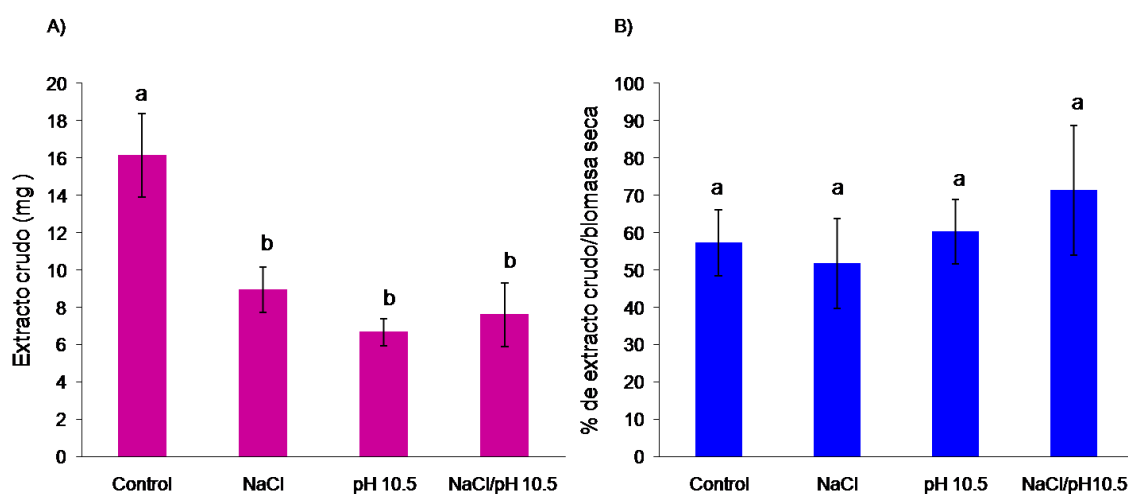


Figura 3.11. Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

Los extractos crudos de todas las muestras fueron transesterificados y analizados por cromatografía de gases (GC) como se describió previamente, y se calculó el porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto y a la biomasa seca, (Tabla 3.2 y Figura 3.12).

Tabla 3.2 Variación de ésteres metílicos obtenidos de *C. reinhardtii* en respuesta a estrés por pH alcalino 10.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos.

Tratamientos	Ésteres metílicos (%).					Ésteres metílicos totales (%) ¹ .
	C-16	C-18	C-18:1 cis	C-18:1 trans	C-18:2	
Respecto a extracto						
Control	1.47 ± 0.82	0.10 ± 0.04	2.50 ± 1.36	1.29 ± 0.75	1.33 ± 0.74	6.79 ± 0.83 a
NaCl	3.39 ± 1.79	0	6.52 ± 3.83	6.45 ± 8.7	2.04 ± 1.01	18.42 ± 2.67 b
pH 10.5	0.68 ± 0.47	0.03 ± 0.02	0.72 ± 0.56	0.31 ± 0.18	0.33 ± 0.17	2.09 ± 0.27 c
NaCl/pH 10.5	4.83 ± 0.51	0.28 ± 0.03	5.66 ± 0.60	0	1.34 ± 0.14	12.12 ± 2.49 d
Respecto a biomasa seca						
Control	0.88 ± 0.35	0.06 ± 0.01	1.59 ± 0.58	0.81 ± 0.23	0.80 ± 0.28	4.17 ± 0.51 a
NaCl	2.54 ± 0.54	0	4.73 ± 1.34	4.04 ± 5.06	1.58 ± 0.35	12.91 ± 1.79 b
pH 10.5	0.45 ± 0.24	0.02 ± 0.1	0.46 ± 0.37	0.22 ± 0.06	0.25 ± 0.07	1.43 ± 0.17 c
NaCl/pH 10.5	4.29 ± 0.73	0.25 ± 0.04	5.03 ± 0.85	0	1.19 ± 0.20	10.77 ± 2.21 b

¹Porcentajes ± SD de tres réplicas. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n=3).

El cultivo sometido al tratamiento de NaCl presentó una mayor acumulación de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo y a la biomasa seca, presentando porcentajes con respecto al extracto crudo de éster metílico del ácido hexadecanoico de 3.34%, éster metílico del ácido octadecanoico 0%, éster metílico del ácido octadecenoico (cis) 6.52%, éster metílico del ácido octadecenoico (trans) 6.45% y éster metílico del ácido octadecadienoico 2.04%. Los porcentajes con respecto a la biomasa seca fueron: de éster metílico del ácido grasos hexadecanoico de 2.54%, éster metílico del ácido octadecanoico 0%, éster metílico del ácido octadecenoico (cis) 4.73%, éster metílico del ácido octadecenoico (trans) 4.04% y éster metílico del ácido octadecadienoico 1.58%. Con el tratamiento de NaCl no observó la presencia del éster metílico del ácido octadecanoico (C-18:0), mientras que con el cultivo del tratamiento de NaCl/pH 10.5 no se observó la presencia del éster metílico del ácido octadecenoico (C-18:1trans). Por otra parte, en la tabla 3.2 y la figura 3.12, graficas C y D, se observa el porcentaje total de ésteres metílicos (suma de los porcentajes individuales de los ésteres metílicos) en relación al extracto crudo y a la biomasa seca, respectivamente; con lo que se tiene que con el tratamiento de estrés por NaCl se obtuvo una mayor cantidad de ésteres metílicos 18.42% con respecto al extracto crudo y 12.91% con respecto a la biomasa seca. Sin embargo,

con respecto a la biomasa seca el tratamiento de NaCl y el tratamiento de NaCl/pH10.5 son estadísticamente iguales (figura 3.12, grafica D), lo cual nos indica que la cantidad de biomasa seca de ambos tratamientos era similar (figura 3.10, grafica B). En cambio la diferencia significativa entre estos mismos dos tratamientos que se presentó con respecto al extracto, indica que en el extracto del cultivo del tratamiento NaCl había una mayor cantidad de triglicéridos que después de la transesterificación se convirtieron en ésteres metílicos (Figura 3.12, grafica C), y por lo tanto el porcentaje obtenido de ésteres metílicos con respecto al extracto resulta ser mayor.

Estos resultados son muy interesantes, ya que los primeros resultados (de peso seco, concentración celular y extracto crudo obtenido de los cultivos) indican que la mayoría de los cultivos con tratamiento de estrés acumularon menos biomasa y menos extracto crudo. Las gráficas de la figura 3.12 nos indican que de los lípidos procedentes de los con tratamientos de estrés por NaCl y NaCl/pH 10.5 se obtuvo una mayor cantidad de ésteres metílicos, y por tanto debe haber una mayor presencia de triglicéridos en los extractos crudos. De esta manera, los ésteres metílicos producidos a partir de los lípidos obtenidos de cultivos con tratamiento de NaCl fueron los de mayor porcentaje. Lo anterior indica que a pesar de haber obtenido una menor cantidad de lípidos a partir de los cultivos con tratamiento de estrés NaCl y NaCl/pH10.5, estos están formados por una mayor cantidad de triglicéridos a diferencia de los cultivos control. Esto resulta interesante, ya que este aumento quizá podría deberse a que este tratamiento de estrés con NaCl produjo un aumento de glicerol, el cual es precursor de la síntesis de triglicéridos [6], lo que resultó en una mayor cantidad de ésteres metílicos en comparación con los otros tratamientos. Por otra parte resulta importante destacar que *C. reinhardtii* produce ácidos grasos que se adecuados para la producción de biodiesel C18:1 y C-18:2 [69, 70].

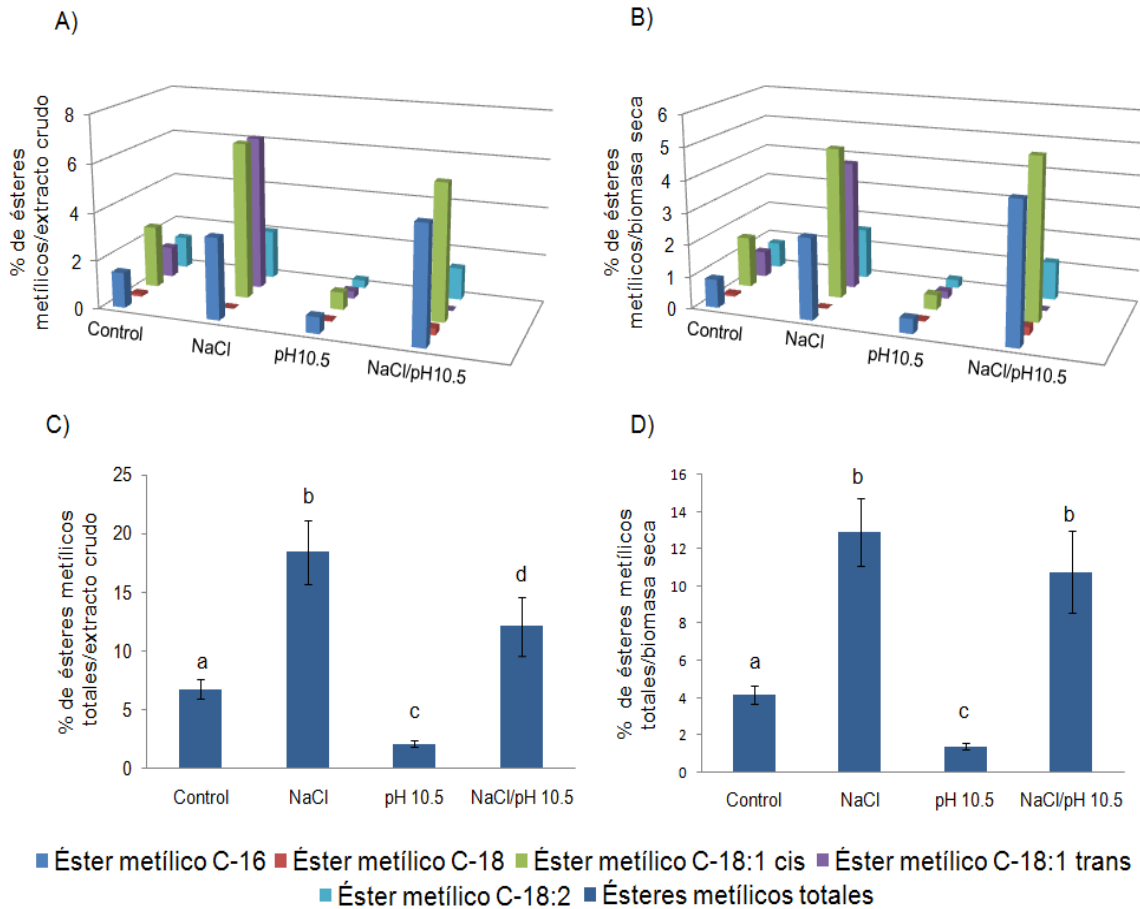


Figura 3.12. Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

3.3.4.3 Comparación del efecto de los tratamientos de estrés en la obtención de ésteres metílicos totales.

Se evaluó la cantidad de ésteres metílicos totales obtenida de *C. reinhardtii* bajo estrés por pH alcalino 10.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos. En la figura 3.13 se pueden observar estos resultados. La cantidad de ésteres metílicos totales que se obtuvo a partir del tratamiento NaCl fue de 1.64 mg, mientras que a partir de los tratamientos por pH 10.5 y de NaCl/pH 10.5, se obtuvieron 0.39 mg y 0.92 mg

respectivamente. Como se observa en esta figura, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

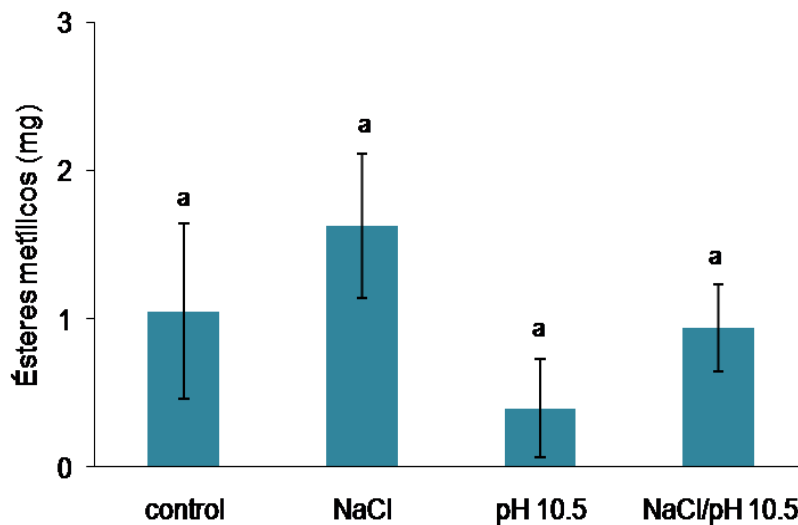


Figura 3.13. Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino (10.5). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3).

3.4 Conclusiones

En este trabajo se detectaron cinco ésteres metílicos de los extractos transesterificados de *Chlamydomonas reinhardtii*: éster metílico del ácido hexadecanoico (C-16), éster metílico del ácido octadecanoico (C-18), éster metílico del ácido octadecenoico (C-18:1cis y C-18:1 trans) y éster metílico del ácido octadecadienoico (C-18:2).

Se observó una variación tanto en la presencia como en la cantidad de ésteres metílicos en respuesta a los diferentes tratamientos de estrés.

El tratamiento de N se consideró como el más recomendable para la obtención de ésteres metílicos adecuados para la producción de biodiesel de buena calidad. Con este tratamiento se obtuvo un mayor porcentaje del éster metílico del ácido octadecenoico (C-18:1cis) y del éster metílico del ácido octadecadienoico (C-18:2).

Por otro lado, aunque con los tratamientos de N y NaCl/N se acumuló menos biomasa y se obtuvo menor cantidad de extracto, la cantidad de ésteres metílicos totales fue mayor que en el cultivo control.

En este trabajo se observó que el estrés por pH alcalino de 10.5 es negativo tanto para la acumulación de biomasa como para la acumulación de ésteres metílicos en la microalga *C. reinhardtii*.

Capítulo 4. Análisis de perfil de ésteres metílicos en el cultivo de *Chlorella saccharophila* bajo condiciones de estrés por disminución de la fuente de nitrógeno, pH alcalino y estrés osmótico por NaCl.

4.1 Introducción

Las microalgas verdes pueden acumular grandes cantidades de biomasa en un tiempo corto, el tiempo de duplicación de biomasa durante la etapa de crecimiento exponencial puede llegar a ser tan corto como 3.5 h [3, 69]. Esta capacidad de acumulación de biomasa aunada a la capacidad de acumulación de lípidos, hace que las microalgas verdes sean consideradas como una opción atractiva como fuente de lípidos para producción de biocombustibles como el biodiesel. Las microalgas verdes del género *Chlorella* actualmente son consideradas en diversos estudios [3, 30, 54, 55, 66] como una materia prima con gran potencial para la obtención de biodiesel, debido a su capacidad de acumular grandes cantidades de biomasa y sintetizar lípidos, principalmente en forma de triglicéridos, ya que un promedio de 28% a 63% de su biomasa seca corresponde a lípidos [3]. En este estudio se utilizó la especie de microalga verde *Chlorella saccharophila*, proveniente de la colecta realizada por la Q.F.B Silvia J. López Adrián en un cuerpo de agua del Parque Hundido del Fraccionamiento Brisas (20° 59' 30.49" N 89° 34' 58.19" O) en la ciudad de Mérida, Yucatán. Hasta donde se ha revisado, en la literatura no hay estudios sobre los lípidos ni sobre el potencial de esta especie en particular como materia prima para la obtención de biodiesel. Debido a lo anterior, el estudio de esta cepa de *Chlorella saccharophila* nativa del Estado de Yucatán, resulta relevante ya que la información obtenida servirá para identificar su potencial como materia prima para la obtención de biodiesel, y podría presentar ventajas para establecer su cultivo bajo las condiciones ambientales del Estado.

Se ha observado en diferentes estudios que la acumulación de lípidos en las microalgas puede incrementarse bajo ciertas condiciones de cultivo, por ejemplo estrés por disminución de nutrientes [33, 44, 45, 46] y pH alcalino [47]. Por otro lado, en otros estudios [40, 41, 43, y 64] se ha mencionado que el estrés osmótico puede producir un aumento en la producción del glicerol, el cual es un precursor de la síntesis de triglicéridos [6], por lo que es posible que la condición de estrés osmótico en los cultivos tenga como

resultado un aumento del glicerol, el cual posteriormente resulte en un aumento de triglicéridos al ser sometidos a estrés por disminución de la fuente de N ó a estrés por pH alcalino.

Por lo antes mencionado, en este capítulo se realizó la evaluación de los ésteres metílicos obtenidos del cultivo de la especie de microalga *C. saccharophila* bajo condiciones de estrés, tales como disminución de la fuente de nitrógeno y por pH alcalino (9.5 y 10.5), así como por la combinación de estos tipos de estrés con estrés osmótico por NaCl.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Determinación del medio de cultivo

Para determinar el medio más adecuado para el cultivo de *C. saccharophila*, se evaluaron cuatro diferentes medios de cultivo: medio TAP, medio BB, medio FITZ, medio BG11 (Capítulo 2). Se prepararon matraces de 50 mL de capacidad con 10 mL de cada medio de cultivo (tres matraces por medio de cultivo a evaluar). Cada matraz fue inoculado con 10,000 células de pre-cultivo y posteriormente los matraces se incubaron por 23 días, haciendo muestreos cada tercer día para realizar conteo celular y determinar el medio en el que las microalgas crecen más rápido y acumulan una mayor cantidad de biomasa.

4.2.2 Curva de crecimiento

Para determinar el tiempo óptimo de cultivo de *C. saccharophila* se realizó una curva de crecimiento, para lo cual se llevó a cabo un cultivo en 50 mL de medio TAP por triplicado durante 14 días. Se muestreó cada segundo día y se determinó la concentración celular siguiendo el método descrito en el Capítulo 2.

4.2.3 Experimentos de estrés

Para cumplir con el primer objetivo de este trabajo, se diseñaron tres experimentos para *C. saccharophila*: el experimento 1 se diseñó con el fin de analizar el perfil de ésteres

metílicos de esta microalga bajo estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos (Figura 4.1). El experimento 2 se diseñó para analizar de nuevo el perfil de ésteres metílicos de *C. saccharophila*, pero ahora bajo estrés por pH alcalino 9.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de ambos (Figura 4.2). El experimento 3 se diseñó para analizar una vez más el perfil de ésteres metílicos de *C. saccharophila*, pero ahora bajo estrés por pH alcalino 10.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos (Figura 4.2). Posteriormente estos experimentos se repitieron para verificar que los resultados fueran replicables.

Los tratamientos de estrés y el control se realizaron por triplicado (figuras 4.1 y 4.2). Se utilizó el medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP) [57], con las modificaciones pertinentes para los experimentos de estrés resultando los medios TAP_{-N}, TAP_{pH 9.5} y TAP_{pH 10.5}, los cuales se prepararon como se indica en el Capítulo 2. Para los experimentos de estrés osmótico se utilizó una solución 1 M de NaCl.

El pre-cultivo se inició con una colonia de *C. saccharophila* en 50 mL de medio TAP por diez días hasta alcanzar el final de la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 22×10^6 cel·mL⁻¹). Se tomó una alícuota de este pre-cultivo para inocular 50 mL de medio TAP con $10,000$ cel·mL⁻¹, y se mantuvo en cultivo por 10 días, al final de los cuales se realizaron los tratamientos correspondientes. Se probaron cinco tratamientos de estrés, como se describe en el capítulo 2: disminución de la fuente de nitrógeno (N), estrés osmótico por cloruro de sodio (NaCl), estrés por pH alcalino (9.5 ó pH10.5), la combinación de estrés osmótico con disminución de la fuente de nitrógeno (NaCl/N), la combinación de estrés osmótico con estrés por pH alcalino (NaCl/pH 9.5 ó NaCl/pH10.5).

Al finalizar los tratamientos se tomó una alícuota de 900 μ L para la determinación de la concentración celular, se recuperó la biomasa por centrifugación a 4000 rpm por 7 min a 25 °C, se retiró el sobrenadante y se concentró la pastilla en tubos tipo "ependorf" por centrifugación a 14000 rpm por 1 min. Posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron en un ultracongelador a - 80 °C por 1 día. Finalmente la biomasa se liofilizó. Una vez obtenida la biomasa liofilizada se realizó la determinación de la acumulación de la biomasa por peso seco como se describió en el capítulo 2.

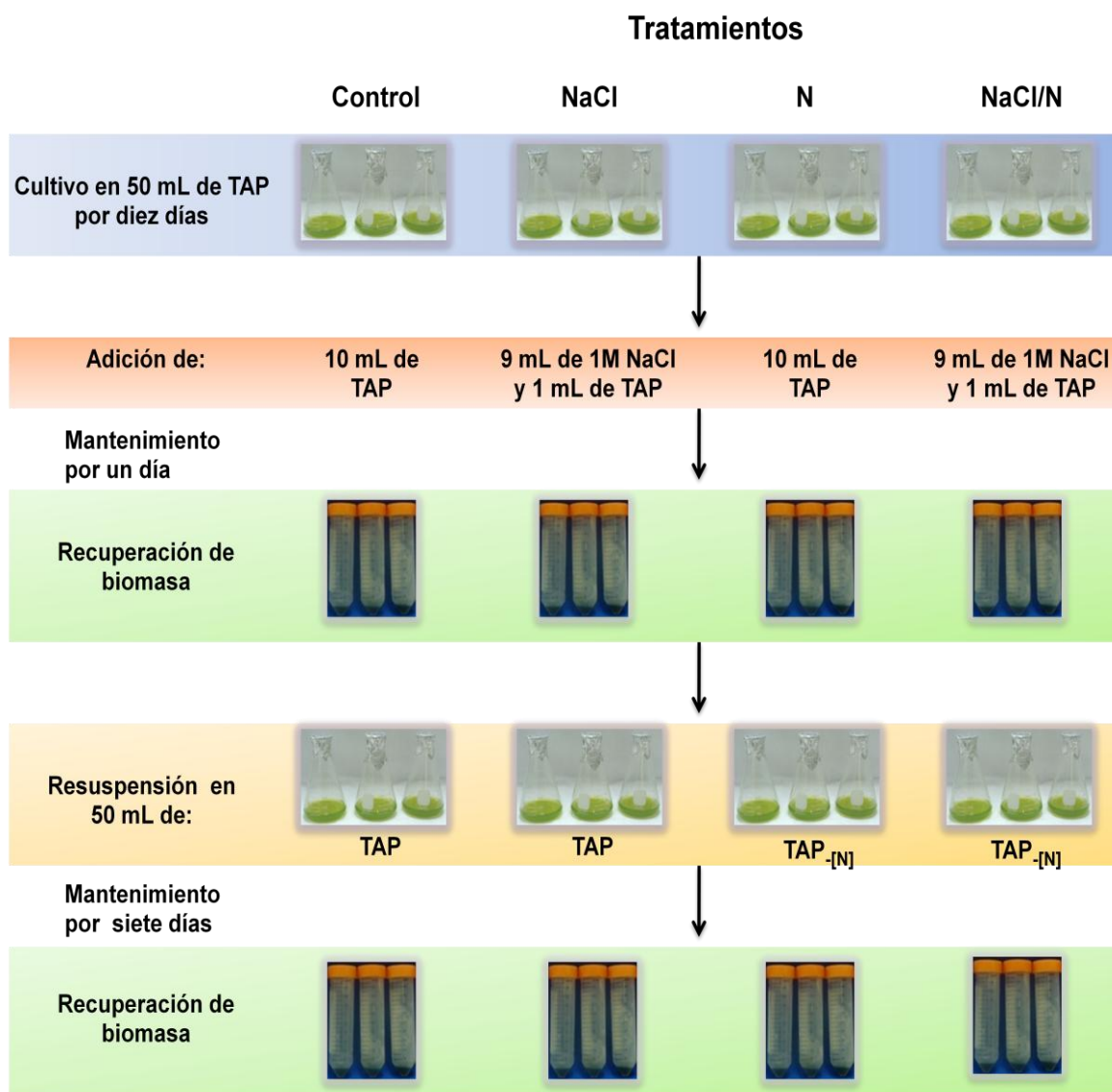


Figura 4.1. Diseño del experimento 1. Análisis del perfil de ésteres metílicos bajo estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de estos tratamientos (n=3).

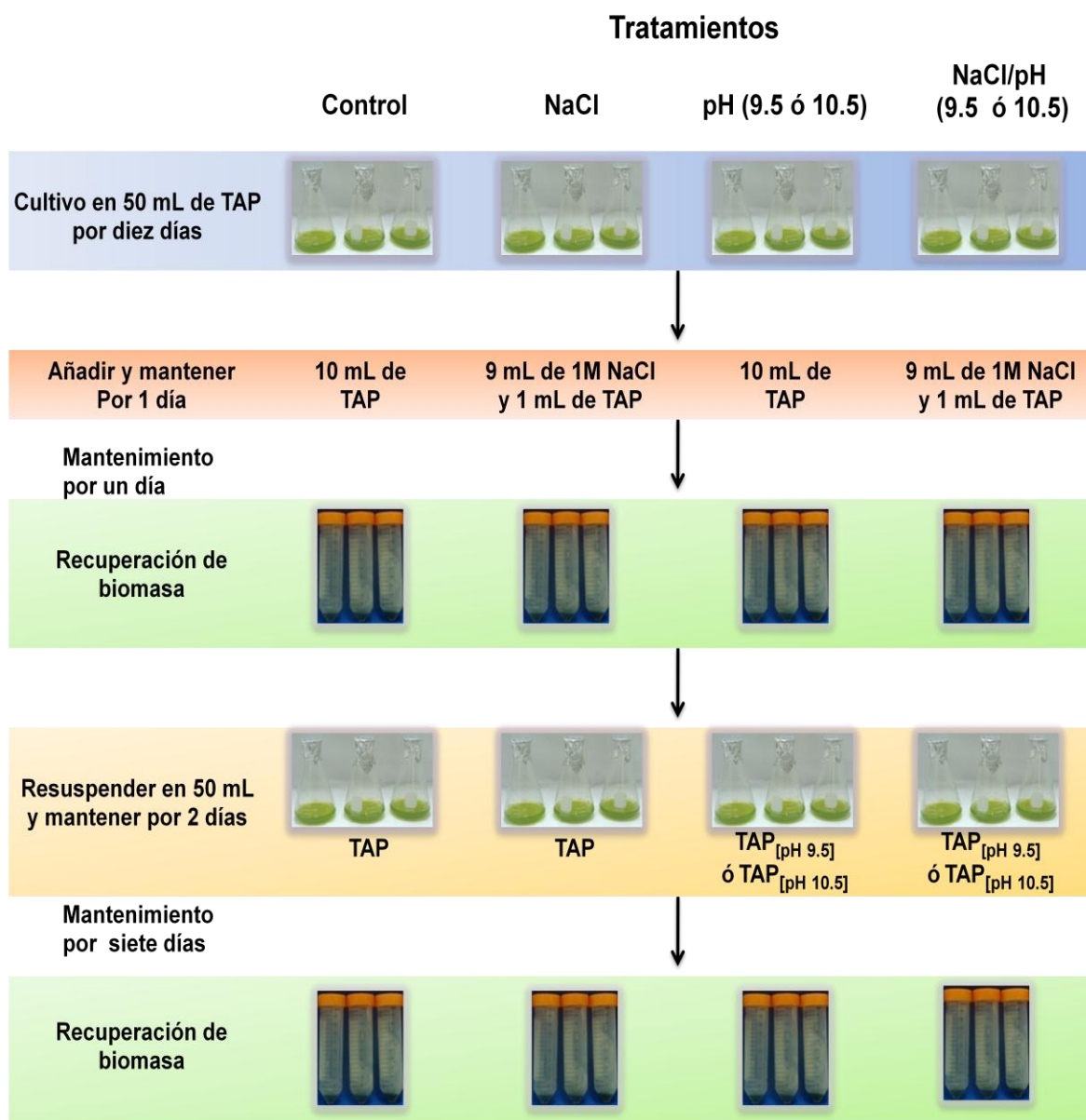


Figura 4.2. Diseño de los experimentos 2 y 3. Análisis del perfil de ésteres metílicos bajo estrés por pH alcalino (9.5 ó 10.5), por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de estos tratamientos (n=3).

4.2.4 Análisis de ésteres metílicos.

Para la extracción de los lípidos, se obtuvo el peso seco de la biomasa y se calculó la relación de solvente para la extracción de lípidos (0.394 mL de solvente cloroformo/metanol 2:1 v/v por cada miligramo de biomasa seca). La biomasa seca fue transferida a un matraz de 50 mL y con la ayuda de una espátula se deshizo la pastilla,

posteriormente se añadió la cantidad de solvente necesaria para la extracción de lípidos, se incubó en una incubadora a 38 °C con agitación a 150 rpm por 3 h. Después de este tiempo la mezcla de extracción (solvente más la biomasa) fue transferida a un tubo Falcon y se dejó precipitar la biomasa por media hora. Enseguida con la ayuda de una micropipeta se transfirió el sobrenadante a un vial. La biomasa residual se dejó secar, y se le realizó una segunda extracción usando la misma cantidad de solvente utilizada anteriormente. El sobrenadante y la biomasa resultante de las dos extracciones se dejaron secar en una campana de extracción. Una vez que el solvente se evaporó del sobrenadante de la muestra, lo que quedó se consideró como el extracto crudo obtenido y fue pesado. También se obtuvo el peso de la biomasa residual resultante del proceso de extracción.

El extracto crudo se utilizó para la reacción de transesterificación como se describió en el Capítulo 2, y se analizó por cromatografía de gases para determinar la concentración de ésteres metílicos como se indicó en el Capítulo 2.

Por otra parte, la muestra transesterificada correspondiente al control del experimento de disminución de la fuente de nitrógeno fue analizada por cromatografía de gases masas (GC-MS) para identificar los ésteres metílicos presentes.

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Determinación del mejor medio de cultivo

Debido a que el cultivo de la cepa de *C. saccharophila* usada en este trabajo había permanecido en condiciones de mantenimiento de cultivo desde su aislamiento, es decir, no se había intentado acumular biomasa, fue necesario realizar un experimento para determinar el medio de cultivo más adecuado para este propósito. Por tanto, se evaluaron cuatro diferentes medios de cultivo (Figura 4.3), tres de los cuales (BB, FITZ y BG11) se han reportado para el cultivo de especies de microalgas del género *Chlorella*, mientras que hasta donde se revisó en la literatura, el medio TAP no había sido reportado como un medio de cultivo para este género de microalgas. Sin embargo, se decidió evaluarlo debido a que se ha utilizado por muchos años para el cultivo de la especie de microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* con buenos resultados, y además algunos de los nutrimentos empleados para su preparación provenían de fuente o fuentes similares o

iguales, aunque en diferentes concentraciones, que los empleados para la preparación de los otros medios (BB, FITZ y BG11) que se han reportado para el cultivo de estas microalgas.

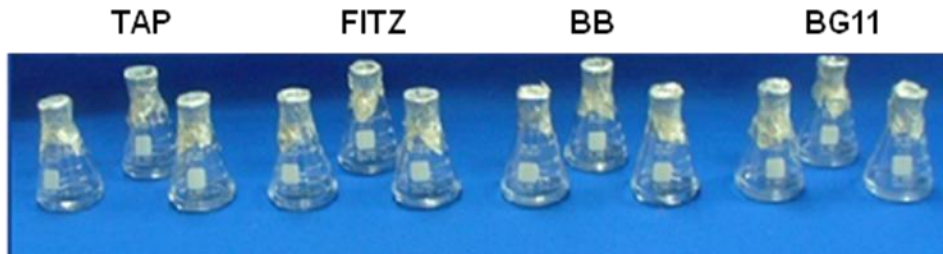


Figura 4.3. Inicio de evaluación de cuatro medios de cultivo. TAP = medio Tris-Acetato-Fosfato, BB = medio Bold Basal, FITZ = medio Fitzgerald y BG11 = medio BG11.

En la gráfica de la figura 4.4 se presenta la curva de crecimiento de *C. saccharophila* en los diferentes medios de cultivo. Se puede ver que en el medio TAP presentó un mayor crecimiento celular (20×10^6 cel/mL). Además la etapa de crecimiento exponencial comenzó más pronto, aproximadamente después del día 5 de cultivo, mientras que en los demás medios la etapa exponencial de crecimiento inició después del día 17 aproximadamente, con una concentración celular mucho más baja que la alcanzada en el medio TAP. Cabe destacar que el medio TAP no había sido reportado anteriormente como un medio de cultivo para microalgas del género *Chlorella* y sin embargo fue el que dio mejores resultados en este estudio (Figura 4.4).

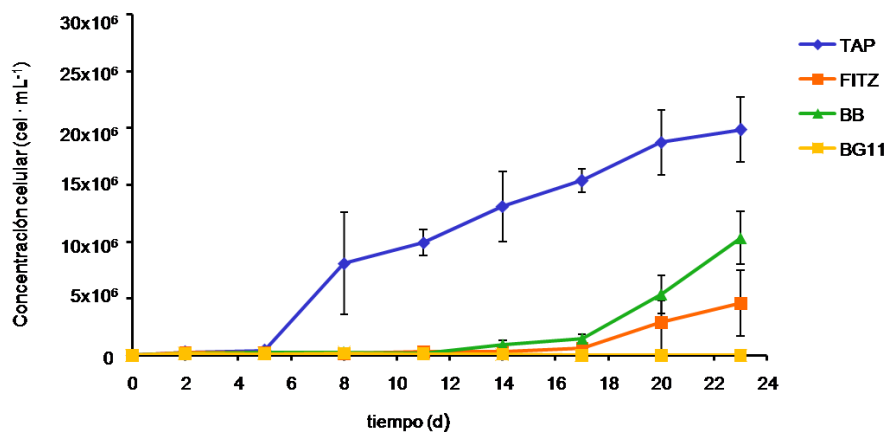


Figura 4.4. Curvas de crecimiento de *Chlorella saccharophila* en diferentes medios de cultivo, sin ácido acético para los medios de cultivo; FITZ, BB y BG11.

Con base en los resultados de la figura 4.4, se hizo un análisis para definir lo que pudiese estar pasando con los medios de cultivo que presentaron una muy baja concentración celular en comparación con TAP y se llegó a la conclusión que muy probablemente como el medio TAP lleva ácido acético (el cual es una fuente de carbono) y los demás medios no, esto originaba un mayor crecimiento celular. Por lo tanto se realizó un experimento similar al anteriormente descrito adicionando ácido acético en la misma proporción que la utilizada en medio TAP a los demás medios de cultivo FITZ, BB, BG11 (Figura 4.5).

En la figura 4.5 A se muestra cómo a partir del día 5 de cultivo se observó un crecimiento notorio de las microalgas en los diferentes medios, con excepción del medio BG11 en la que aparentemente no hubo crecimiento celular. En los cultivos con medio TAP se observó cualitativamente una coloración verde uniforme, mientras que con los medios FITZ y BB se observó aglomeración de las células. En la figura 4.5 B se observa que para el día 11 de cultivo el crecimiento celular visualmente es más homogéneo (coloración verde) y sin aglomeraciones en los medios TAP, FITZ y BB, mientras que en BG11 no se aprecia crecimiento aparente. Por otro lado, en la figura 4.5 C se observa el progreso del cultivo de las microalgas en los medios evaluados para el día 17 de cultivo, el cultivo en medio TAP aun luce verde, mientras que los cultivos en los medios FITZ y BB han empezado a tomar un color amarillento (desde el día 15), lo que podría relacionarse con un cultivo viejo en el que las células están comenzando a morir. Por otra parte el cultivo en medio BG11 siguió sin mostrar crecimiento celular notorio, y nunca presentó coloración verde. Finalmente en la figura 4.5 D puede verse que el cultivo en medio TAP a pesar de que han pasado varios días aún presenta coloración verde, mientras que en FITZ y BB los cultivos se ven amarillentos, y el cultivo medio BG11 siguió sin mostrar crecimiento aparente. La posible razón de que en medio BG11 no mostrara crecimiento celular como en los otros medios, era quizá que el medio BG11 tiene menor cantidad (0.0125 mg/L) del compuesto $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, el cual es una fuente de nitrógeno, a diferencia de los otros medios como TAP que tiene 1 mg/L, BB 0.86 mg/L y FITZ 0.9 mg/L del compuesto respectivamente, además el medio TAP tiene otro compuesto (NH_4Cl) que igualmente proporciona nitrógeno, y se ha reportado que la ausencia o disminución del nitrógeno es un factor de estrés [44, 45,46, 68] que contribuye a inhibir la división celular [30], ya que provoca cambios fisiológicos en las células que reducen su eficiencia fotosintética para recolectar la luz, la transducción de energía y la fijación de CO_2 . La figura 4.5 incluye

imágenes al microscopio óptico (40X) en el que se puede observar que las células de estos cultivos presentaron diferentes tamaños, dependiendo del medio de cultivo.

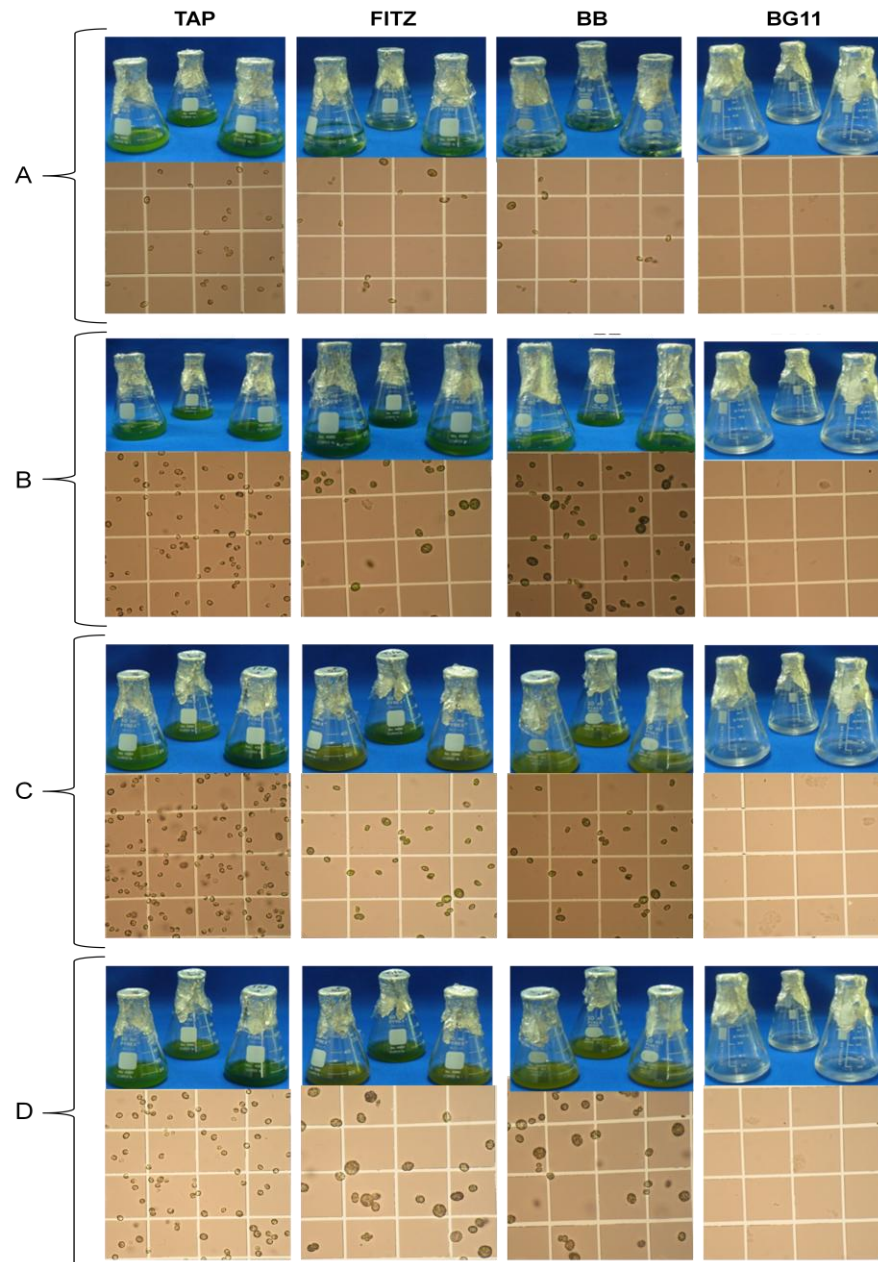


Figura 4.5. Cultivos de *C. saccharophila* en líquido e imágenes de microscopía óptica a 40X de las células en los 4 medios evaluados (todos con ácido acético). A) al día 5 de cultivo, B) al día 11 de cultivo, C) al día 17 de cultivo y C) al día 23 de cultivo.

En la figura 4.6 se presenta la curva de crecimiento de las microalgas en los diferentes medios de cultivo adicionados con ácido acético (en la misma concentración que la usada

en el medio TAP). El medio TAP presentó una mayor concentración celular con $14.16 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el día 17 de cultivo, seguido del medio BB con $11.59 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, posteriormente FITZ con $7.75 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ y finalmente BG11 con $0.125 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el mismo día de cultivo. También se puede apreciar en esta figura que en los medios FITZ y BB conteniendo ácido acético la etapa de crecimiento exponencial inicia aproximadamente después del día 5 de cultivo, más pronto que cuando no contiene ácido acético (Figura 4.4). Igualmente se puede ver que en los medios FITZ y BG11 se alcanza más rápido la fase de crecimiento estacionaria (después del día 11), lo cual se podría relacionar con el hecho de que los cultivos comenzaran a verse amarillentos, mientras que el cultivo en medio TAP alcanza esta misma etapa hasta después del día 17, lo que indica que hasta ese día las células en el medio TAP seguían multiplicándose, mientras que en los otros medios no sucede así.

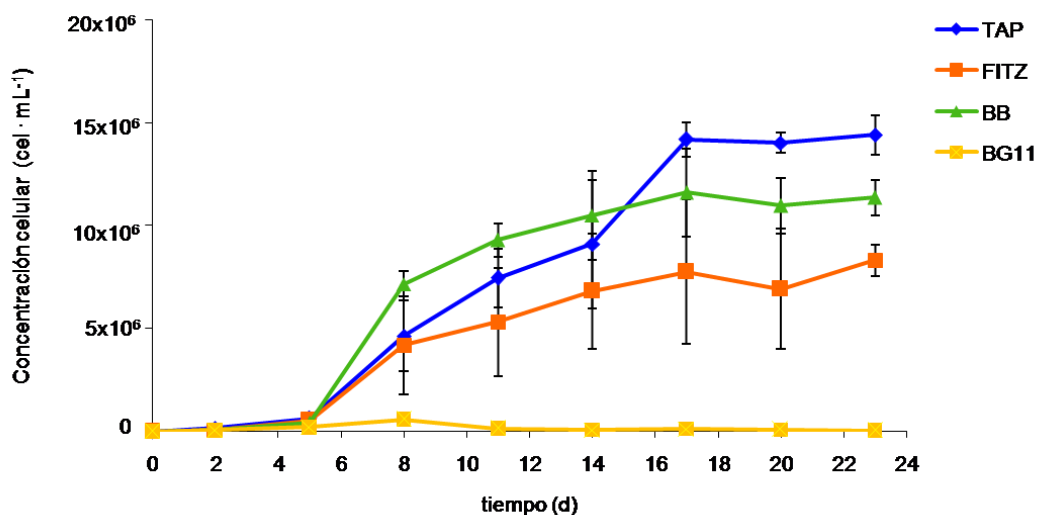


Figura 4.6. Curvas de crecimiento en diferentes medios de cultivo (adicionados con ácido acético).

Con los datos obtenidos de los conteos celulares al día 17, se realizó una prueba estadística ANOVA (análisis de varianza) utilizando el programa Statgraphics Plus para reconocer las posibles diferencias en los tratamientos. Los resultados de esta prueba con un 95% de confianza mostraron que no hay diferencias significativas entre los medios TAP y FITZ, TAP y BB, así como BB y FITZ; el medio BG11 fue significativamente diferente a todos.

A pesar de que la prueba estadística indicó que al día 17 no se encontraron diferencias entre los medios TAP, FITZ y BB en cuanto al número de células, con el medio TAP el cultivo permaneció en etapa de crecimiento exponencial por más tiempo, y por tanto su fase estacionaria se alargó un poco más que con los otros medios. Lo anterior puede explicar la apariencia de los cultivos en TAP que se mantiene verde por más tiempo mientras que con los otros medios se presenta el color amarillento correspondiente a cultivos en el que hay una mayor proporción de muerte celular. Con base en la interpretación biológica de estos resultados se eligió al medio TAP como el más adecuado para el cultivo de *C. saccharophila* para la realización de los experimentos posteriores.

4.3.2 Curva de crecimiento

Una vez establecido que el medio TAP era el medio adecuado para el cultivo de *C. saccharophila*, se procedió a la determinación del tiempo óptimo de cultivo en el cual se acumula la mayor cantidad de biomasa. Para ello se realizó la curva de crecimiento del cultivo de *C. saccharophila* (figura 4.7).

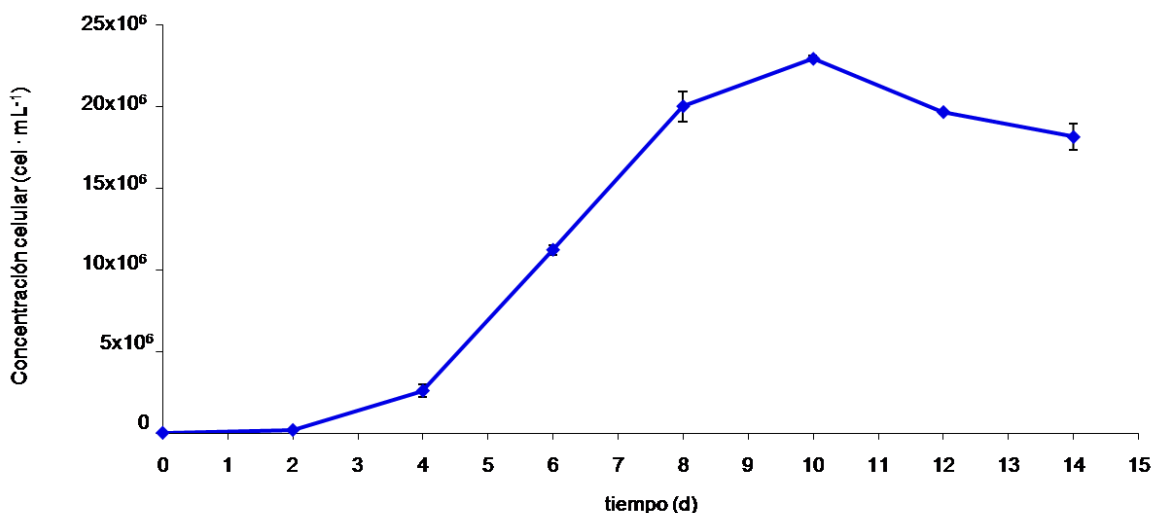


Figura 4.7. Curva de crecimiento *C. saccharophila*

Se puede observar que la mayor concentración celular ($22.941 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) se obtuvo aproximadamente al día 10 de cultivo, a partir del cual se observó la etapa estacionaria. En este trabajo se escogió el día 10 para aplicar la condición de estrés respectiva, ya que

corresponde al día que comienza la fase estacionaria, por lo que se asume que debe haber más biomasa.

En este experimento, se obtuvo una concentración celular máxima de 22.941×10^6 cel·mL⁻¹. Como se ha mencionado, hasta donde se ha revisado en la literatura no existen reportes de estudios para esta especie de microalga. Illman *et al.* [31] realizaron estudios para otras especies de microalgas del género *Chlorella* y obtuvieron concentraciones celulares de hasta 5.7×10^6 cel·mL⁻¹ para *C. vulgaris*, 6×10^6 cel·mL⁻¹ para *C. minutissima*, 2×10^6 cel·mL⁻¹ para *C. emersonii* después de 14 días de cultivo. Podemos observar que *C. saccharophila*, acumula también una gran cantidad de células (biomasa). Esta diferencia en cuanto a la acumulación de biomasa podría deberse a las condiciones de cultivo utilizadas, ya que por ejemplo en el estudio realizado por Illman *et al.* [31] utilizaron 100 mL de medio de cultivo Watanabe e incubaron a 25 °C con agitación a 60 rpm en fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad, mientras que en el presente estudio los cultivos en 50 mL de medio TAP se incubaron a 25° con agitación a 140 rpm en fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

4.3.3 Identificación de ésteres metílicos por cromatografía de gases masas (GC/MS)

Los ésteres metílicos presentes en el extracto transesterificado de una muestra control de *C. saccharophila* fueron identificados por cromatografía de gases masas (GC/MS). Los ésteres metílicos de ácidos grasos identificados fueron: éster metílico del ácido hexadecanoico (C-16), éster metílico del ácido octadecanoico (C-18) y éster metílico del ácido octadecenoico (C-18:1 cis y C-18:1 trans). Como ya se ha mencionado, no se han encontrado estudios previos sobre la producción de lípidos, ni sobre los metil ésteres obtenidos con *C. saccharophila*. Sin embargo, en el estudio realizado por Xu *et al.* [66] con la especie de microalga *Chlorella protothecoides*, se obtuvieron los ésteres metílicos siguientes: éster metílico de ácido tetradecanoato (C-14), éster metílico de ácido hexadecanoico (C-16), éster metílico de ácido heptadecanoico (C-17), éster metílico de ácido octadecanoico (C-18), éster metílico de graso octadecenoico (C-18:1), éster metílico de ácido octadecadienoico (C-18:2), éster metílico de ácido nonadecenoico (C-19:1), éster metílico de ácido eicosanoico (C-20) y el éster metílico de ácido ecosenoico (C-

20:1). Como se puede ver, existen diferencias entre los ésteres metílicos observados para estas dos especies de microalgas del género *Chlorella*. Por otro lado, estos autores utilizaron el medio de cultivo Bold Basal, y en este trabajo se utiliza el medio TAP así como otras condiciones de cultivo, tales como los diferentes tratamientos y acetato como fuente de carbono, lo cual podría influir en la acumulación del tipo de triglicéridos que se acumulan y por tanto en el tipo de ésteres metílicos que pueden ser detectados por GC/MS.

4.3.4 Efecto del estrés por disminución de la fuente de nitrógeno y la combinación con estrés osmótico por NaCl en el cultivo de *C. saccharophila*

4.3.4.1. Efecto en la acumulación de biomasa

En la figura 4.8, se pueden observar los cultivos sometidos a estrés con los tratamientos de NaCl, N y NaC/N, así como el control. Los cultivos con tratamiento de N y NaCl/N, en los que se disminuyó la fuente de nitrógeno, visualmente presentaron una coloración menos intensa que el control. Por su parte, los cultivos con tratamiento de NaCl en los que la fuente de nitrógeno se mantuvo intacta, visualmente presentaron una coloración similar a la del control, lo cual sugiere que la diferencia de coloración puede deberse al estrés por deficiencia de nitrógeno. En la figura 4.8 se presentan imágenes de las células de *C. saccharophila* al microscopio óptico a 40X, en las que se puede observar que la células de estos cultivos presentan un tamaño similar.

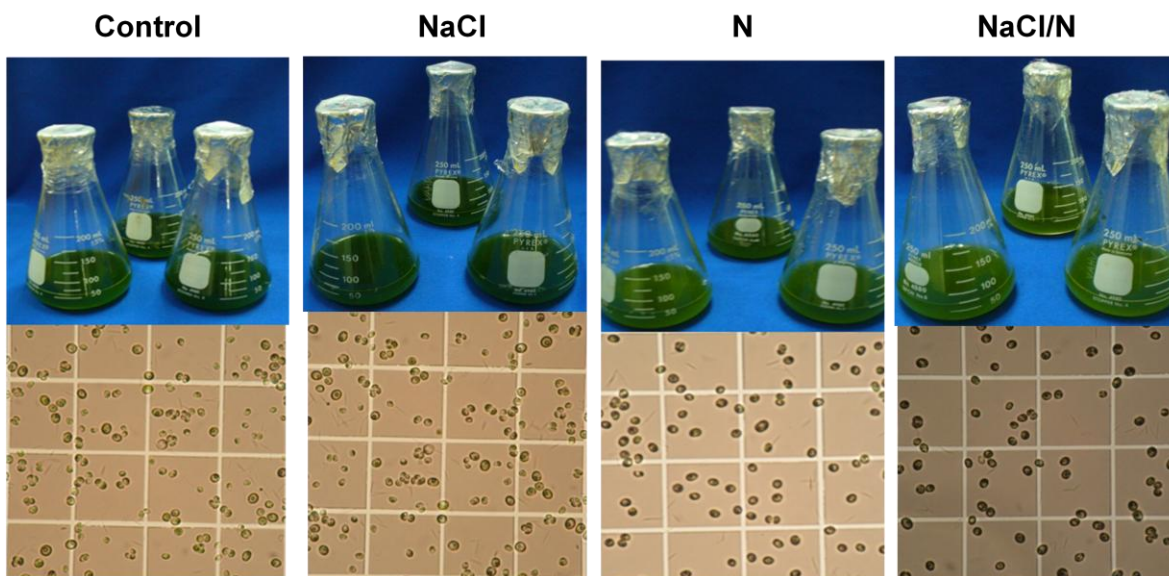


Figura 4.8. Cultivos de *C. reinhardtii*, en matraces con 50 mL de TAP, y células de estos cultivos observadas al microscopio óptico a 40X al final del experimento (día 18), con los diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno.

En la figura 4.9 A, se presenta la concentración celular de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control, en el que se observa que el tratamiento de NaCl presentó un aumento en cuanto al número de células en comparación a los otros tratamientos, ya que contenía $36 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, a diferencia de las $27.7 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el control. Los cultivos de los tratamientos de N y NaCl/N presentaron una disminución significativa en su concentración celular con respecto a los otros tratamientos, con $23 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $19.3 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. Esto sugiere que al igual que con la disminución de la coloración en los cultivos, esta disminución de células puede deberse al estrés por deficiencia de nitrógeno. En estudios previos se han reportado que esta disminución de nitrógeno provoca cambios fisiológicos en las células que reducen su eficiencia fotosintética para recolectar la luz, la transducción de energía y la fijación de CO_2 , lo cual ocasiona una disminución de la concentración de la clorofila a, un aumento en la concentración de los carotenoides, así como una disminución del número de células presentes en los cultivos [44, 45, 46, 68]. Por otra parte en los cultivos con tratamiento de NaCl en los que no se observó una disminución de la coloración, ni una disminución del número de células, quizá la fotosíntesis y crecimiento celular se inhibieron momentáneamente, pero como después del estrés osmótico, las células fueron resuspendidas en medio TAP sin ninguna modificación, las células posiblemente se

recuperaron del estrés. León y Galván [65], mencionan que la microalga *C. reinhardtii* presenta una inhibición del crecimiento celular y de la fotosíntesis en condiciones de estrés osmótico, como también lo mencionan otros autores [40, 41, 42] cuando se utilizan concentraciones de NaCl de 100 hasta 200mM, pero después de que el glicerol, metabolito que actúa como un osmorregulador, es excretado al medio por la microalga, por lo cual ya no hay estrés osmótico, la células se recuperan y dejan de presentar inhibición del crecimiento celular y de la fotosíntesis. No se han encontrado estudios para *C. saccharophila* de que algo similar pudiera estar ocurriendo, sin embargo algún mecanismo fisiológico pudiera estar actuando en la célula para soportar el estrés osmótico y recuperar su crecimiento y multiplicación después del estrés por NaCl.

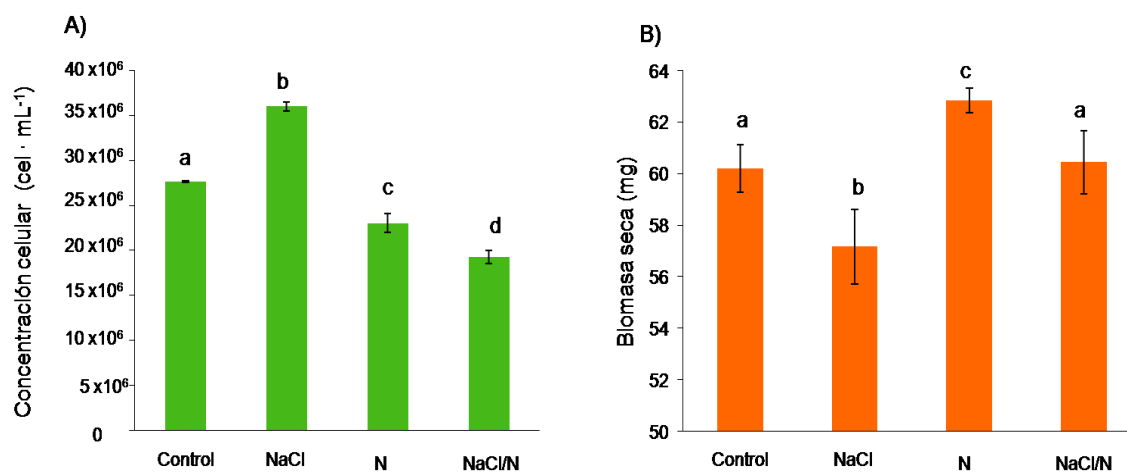


Figura 4.9. Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

Por otro lado, en la figura 4.9 B, se presentan los resultados de la acumulación de la biomasa seca en los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control. Se puede observar que los cultivos con tratamiento de NaCl presentaron una acumulación de biomasa seca de 57.16 mg, la cual fue menor que en el control en el que se acumularon 60.18 mg, y aunque la concentración celular indica que en los cultivos con tratamiento NaCl hay un número de células mayor en comparación a los otros tratamientos, las células de los cultivos con tratamiento de NaCl resultaron menos pesadas, y esto quizá se deba a que acumularon menos metabolitos. Los tratamiento de N y NaCl/N, que

presentaron la menor acumulación celular, presentaron la mayor acumulación de biomasa seca acumulando 62.83mg y 60.43 mg respectivamente, lo cual puede deberse a que acumularon una mayor cantidad de metabolitos.

4.3.4.2 Efecto en la acumulación de ésteres metílicos

Como resultado de la extracción con solventes [33] se obtuvieron lípidos y otros compuestos como pigmentos presentes en las células. Algunos autores que han utilizando la mezcla de solventes cloroformo/metanol nombran como lípido total obtenido al producto de la extracción realizada con este solvente [30,33] En este trabajo se optó por denominarlo como extracto crudo, ya que se sabe que puede contener otros compuesto además de lípidos, como por ejemplo clorofilas y otros pigmentos. En la figura 4.10 A, se presentan los valores promedio del extracto crudo obtenido de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control. Para los cultivos sometidos a tratamiento de NaCl se obtuvo una cantidad de extracto crudo de 30.26 mg, mientras que para el control se obtuvieron 26.33 mg. Estos tratamientos no presentaron diferencias significativas para acumulación extracto crudo a pesar de haber tenido diferencias significativas en la acumulación de concentración celular y biomasa seca. Por otro lado, los cultivos con tratamiento de N y NaCl/N presentaron la mayor cantidad de extracto crudo acumulando 38.06 mg y 37.93.mg respectivamente. En la figura 4.10 B, se presenta el porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca, obtenido de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos. El extracto crudo corresponde a 43.75% de la biomasa seca en los cultivos control, mientras que en los cultivos con tratamiento de NaCl alcanza un 53.17%, en los cultivos con tratamiento de N se obtuvo un 60.53 %, y en los cultivos con tratamiento de NaCl/N se obtuvo un 62.70%. Entre los porcentajes de extracto crudo obtenidos de los cultivos NaCl, N y NaCl/N no hubo diferencias significativas, mientras que el porcentaje de extracto del control es estadísticamente diferente a lo obtenido en los otros tratamientos.

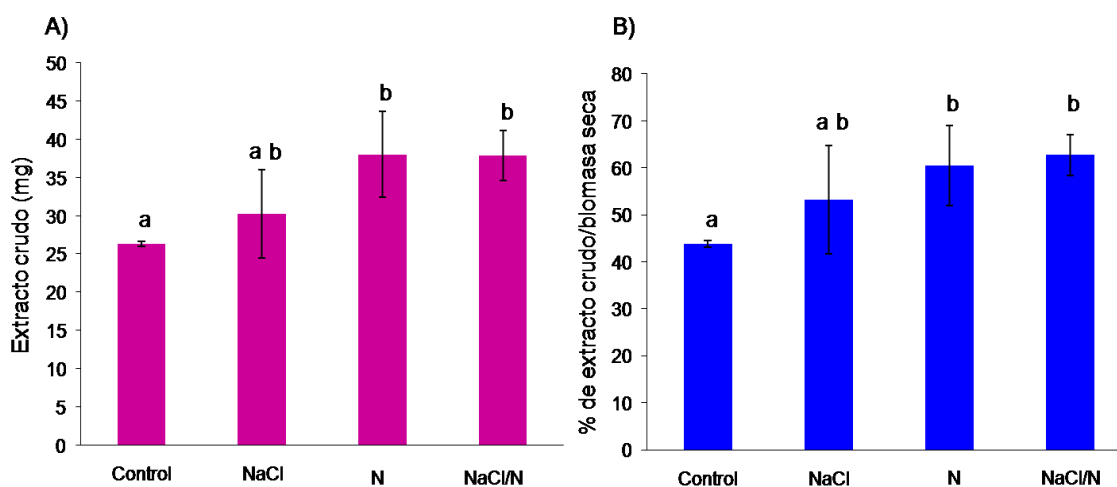


Figura 4.10. Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

Los extractos crudos de todas las muestras fueron transesterificados y analizados por cromatografía de gases (GC) como se describió previamente y se calculó el porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto y a la biomasa seca, (Tabla 4.1 y Figura 4.11).

Tabla 4.1. Variación de ésteres metílicos obtenidos de *C. saccharophila* en respuesta a estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos.

Tratamientos	Ésteres metílicos (%)				Ésteres metílicos totales (%) ¹
	C-16	C-18	C-18:1 cis	C-18:1 trans	
Respecto a extracto					
Control	2.63 ± 0.24	0.33 ± 0.07	14.08 ± 0.56	1.37 ± 0.54	18.42 ± 0.87 a
NaCl	14.54 ± 8.56	0.2 ± 0.10	12.9 ± 8.17	1.29 ± 0.80	28.95 ± 2.67 b
N ₂	6.2 ± 0.69	0.15 ± 0.08	34.5 ± 3.80	1.04 ± 0.15	41.91 ± 3.70 c
NaCl/N ₂	4.44 ± 0.30	0.12 ± 0.04	23.83 ± 2.02	0.82 ± 0.11	29.22 ± 0.47 b
Respecto a biomasa seca					
Control	1.15 ± 0.10	0.14 ± 0.03	6.16 ± 0.25	0.60 ± 0.23	8.06 ± 0.39 a
NaCl	7.13 ± 1.9	0.09 ± 0.04	6.07 ± 3.47	0.61 ± 0.33	13.93 ± 2.90 b
N ₂	3.71 ± 0.31	0.09 ± 0.05	20.66 ± 1.58	0.61 ± 0.01	25.10 ± 1.49 c
NaCl/N ₂	2.77 ± 0.02	0.07 ± 0.02	14.08 ± 0.50	0.51 ± 0.04	18.244 ± 0.61 d

¹Porcentajes ± SD de tres réplicas. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza).

Todos los tratamientos presentaron un aumento en los ésteres metílicos en comparación con el control. Sin embargo, los cultivos del tratamiento N presentaron una mayor acumulación de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo, así como a la biomasa seca. Con respecto al extracto crudo, se obtuvieron porcentajes de éster metílico del ácido hexadecanoico de 6.20%, éster metílico del ácido octadecanoico de 0.15%, éster metílico del ácido octadecenoico (cis) de 34.50% y éster metílico del ácido octadecenoico (trans) de 1.04%, con respecto al extracto. Los porcentajes con respecto a la biomasa seca fueron: éster metílico del ácido hexadecanoico de 3.71%, éster metílico del ácido octadecanoico de 0.09%, éster metílico del ácido octadecenoico (cis) de 20.66% y éster metílico del ácido octadecenoico (trans) de 0.61. En la tabla 4.1 y la figura 4.11C y D, se puede observar el porcentaje de ésteres metílicos totales (suma de los porcentajes individuales de los metil ésteres) en relación al extracto crudo y a la biomasa seca, respectivamente; con lo que se tiene que con el tratamiento de estrés por N se obtuvo una mayor cantidad de ésteres metílicos 41.91% con respecto al extracto y 25.10% con respecto a la biomasa seca.

Estos resultados son muy interesantes, ya que los primeros datos obtenidos (concentración celular) indican que los cultivos con tratamiento de estrés de N y NaCl/N acumularon menos células (biomasa). Sin embargo de estos cultivos con menor número de células se obtuvo una mayor cantidad de extracto crudo y ese extracto estuvo compuesto en su mayoría por triglicéridos, ya que a partir de ellos se obtuvo la mayor cantidad de ésteres metílicos. Este resultado coincide con lo indicado por Widjaja *et al.* [30] quienes mencionan que los cultivos de la microalga *Chlorella vulgaris* sometidos a estrés por disminución de la fuente de nitrógeno acumularon menos biomasa. No obstante, someter los cultivos a este estrés resultaba mejor porque se produjeron más triglicéridos, lo que redundó en una mayor cantidad de ésteres metílicos. Por otra parte los cultivos sometidos a tratamiento de estrés por NaCl, presentaron un leve aumento de los ésteres metílicos con respecto a los cultivos control. Se puede observar que las concentraciones de los ésteres metílicos son mayores para las muestras de estrés. Esto resulta interesante, ya que este aumento quizá podría deberse a que este tratamiento de estrés con NaCl produjo un aumento de glicerol, el cual es precursor de la síntesis de triglicéridos [6], lo que resultó en una mayor cantidad de ésteres metílicos en comparación con el control. Sin embargo este aumento no fue mayor a lo obtenido con los tratamientos

de estrés por disminución de la fuente N. Por otra parte resulta importante destacar que *C. saccharophila* produce en su mayoría ácidos grasos que se consideran adecuados para la producción de biodiesel C-18:1[69, 70].

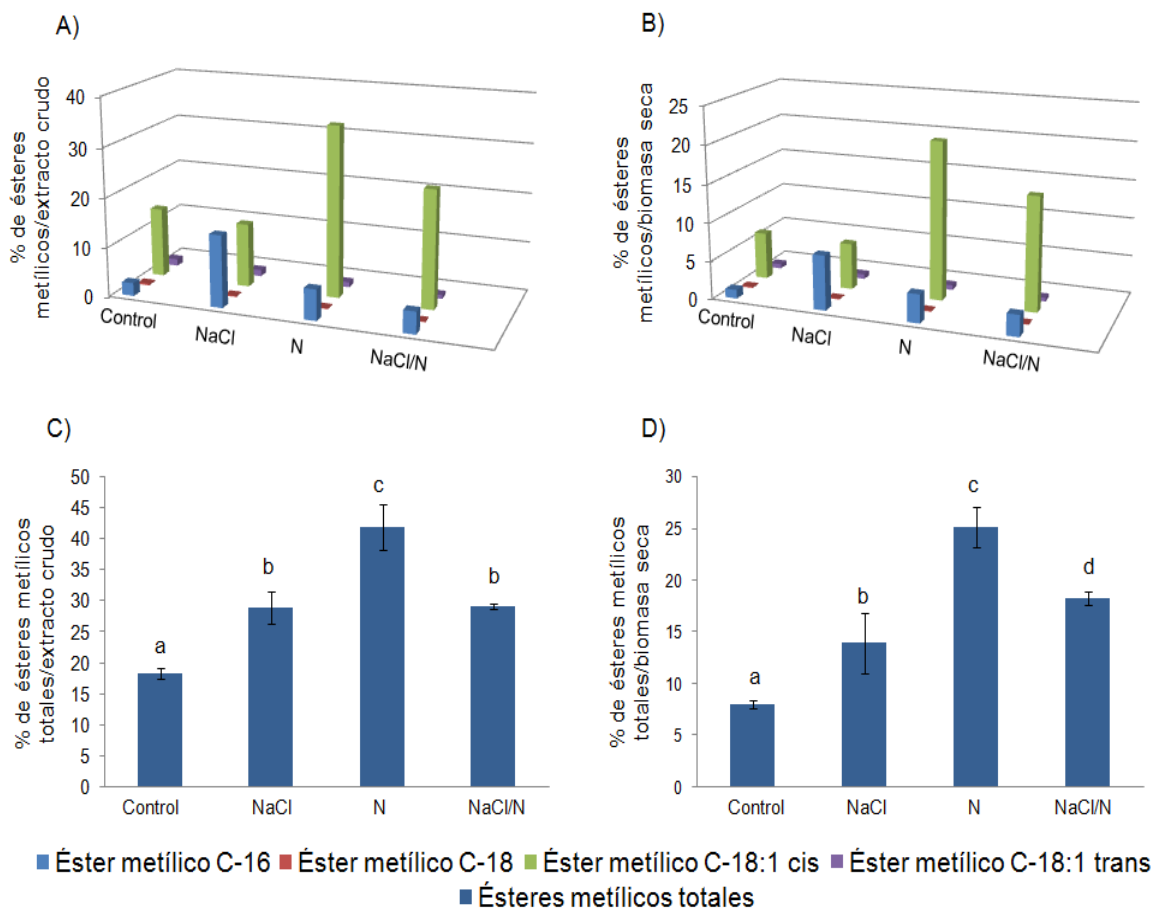


Figura 4.11. Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

4.3.4.3 Comparación del efecto de los tratamientos de estrés en la producción de ésteres metílicos totales.

Se evaluó la cantidad de ésteres metílicos totales de *C. saccharophila* bajo estrés por disminución en la fuente de nitrógeno, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de

éstos. Como se puede observar en la figura 4.12, la mayor cantidad de ésteres metílicos totales se obtuvo a partir del tratamiento N acumulando 15.95 mg, seguido del tratamiento NaCl/N que permitió acumular 11.08 mg, mientras que con el tratamiento NaCl se acumularon 8.76 mg. En la figura también se puede observar que el tratamiento N fue significativamente diferente a los demás tratamientos. Por otra parte, se puede observar en la figura 4.11 con cualquiera de los tratamientos se obtuvieron ésteres metílicos de buena calidad, ya que los ésteres metílicos provenían en su mayoría de triglicéridos formados de ácidos grasos C-18:1, y este se encuentra entre los preferidos para la producción de ésteres metílicos (biodiesel) [69,70], sin embargo, con el tratamiento N la cantidad de C-18:1 tiende a ser mayor que en los demás tratamientos. Por todo lo anterior, se sugiere que el tratamiento N es el más adecuado para la acumulación de biomasa y ésteres metílicos totales, adecuados para la producción de biodiesel, a partir del cultivo de la microalga *C. saccharophila*.

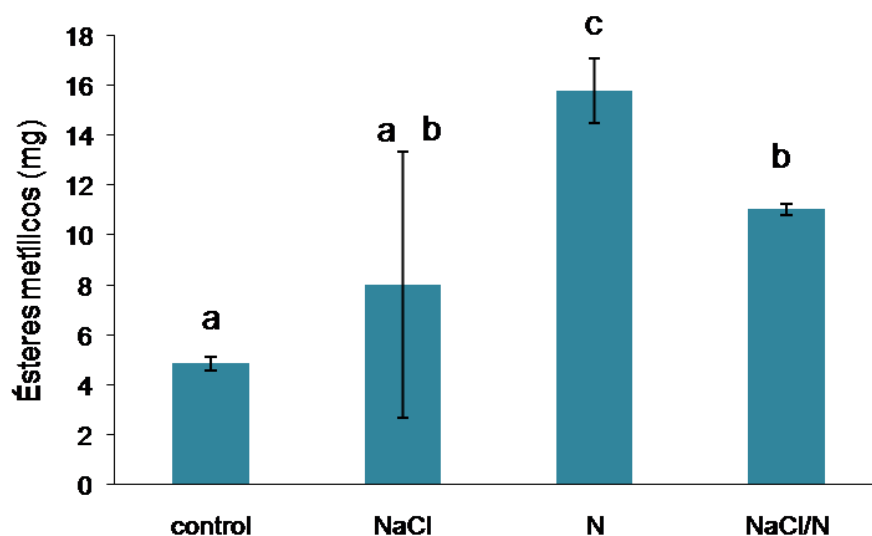


Figura 4.12 Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3).

4.3.5 Efecto del estrés por pH 9.5, y la combinación con estrés osmótico por en el cultivo de *C. saccharophila*.

4.3.5.1. Efecto en la acumulación de biomasa

En la figura 4.13, se pueden observar los cultivos sometidos a estrés con los tratamientos de NaCl, pH 9.5 y NaCl/pH9.5, así como el control. Los cultivos con tratamiento de pH 9.5 y NaCl/pH 9.5, en el que se cambió el pH del medio de cultivo, visualmente presentaron una coloración menos intensa que el control. Por su parte, los cultivos con tratamiento de NaCl, en el que el pH de medio no se cambió, visualmente presentaron una coloración similar a la de control, lo cual sugiere que la diferencia de coloración puede deberse al estrés por pH alcalino (9.5). Por otra parte, en la figura 4.13 se presentan imágenes de las células de *C. saccharophila* al microscopio óptico a 40X, en el que se puede observar que la células de estos cultivos presentan un tamaño similar.

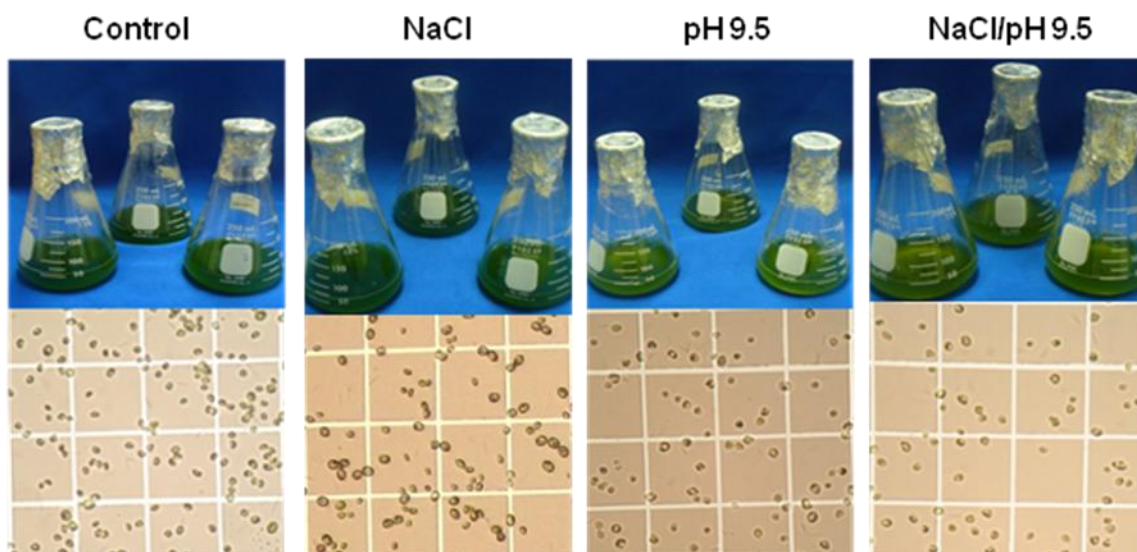


Figura 4.13. Cultivos de *C. reinhardtii*, en matraces con 50 mL de TAP, y células de estos cultivos observadas al microscopio óptico a 40X al final del experimento (día 13), con los diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino.

En la figura 4.14 A, se presenta la concentración celular de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control, en el que se observa que el tratamiento de NaCl presentó una disminución del células presentando $25.5 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, a diferencia de las $30.8 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ obtenidas en el control. Los tratamientos de pH 9.5 y NaCl/pH 9.5

presentaron la mayor disminución en su concentración celular con respecto a los otros tratamientos, con $15.7 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $15.7 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Esto sugiere que al igual que con la disminución de la coloración en los cultivos, esta disminución de células puede deberse al estrés por pH alcalino (9.5). En estudios previos como el de Guckert y Cooksey [47] se ha reportado que el aumento del pH provoca la inhibición de la actividad fotosintética y del ciclo de división celular, lo cual ocasiona una disminución en el número de células presentes en los cultivos. Por otra parte en los cultivos con tratamiento de NaCl en los que no se observó una disminución de la coloración, quizá la fotosíntesis y crecimiento celular se inhibieron momentáneamente, pero como después del estrés osmótico, las células fueron resuspendidas en medio TAP sin ninguna modificación, las células posiblemente se recuperaron del estrés. León y Galván [65], mencionan que la microalga *C. reinhardtii* presenta una inhibición del crecimiento celular y de la fotosíntesis en condiciones de estrés osmótico, como también lo mencionan otros autores [40, 41, 42] cuando se utilizan concentraciones de NaCl de 100 hasta 200mM, pero después de que el glicerol, metabolito que actúa como un osmorregulador, es excretado al medio por la microalga, por lo cual ya no hay estrés osmótico, la células se recuperan y dejan de presentar inhibición del crecimiento celular y de la fotosíntesis. Aunque en este caso no se trata de *C. reinhardtii*, pero si de una microalga verde, pudiese ser que esté pasando lo que León y Galván [62] observaron para la microalga verde *C. reinhardtii*.

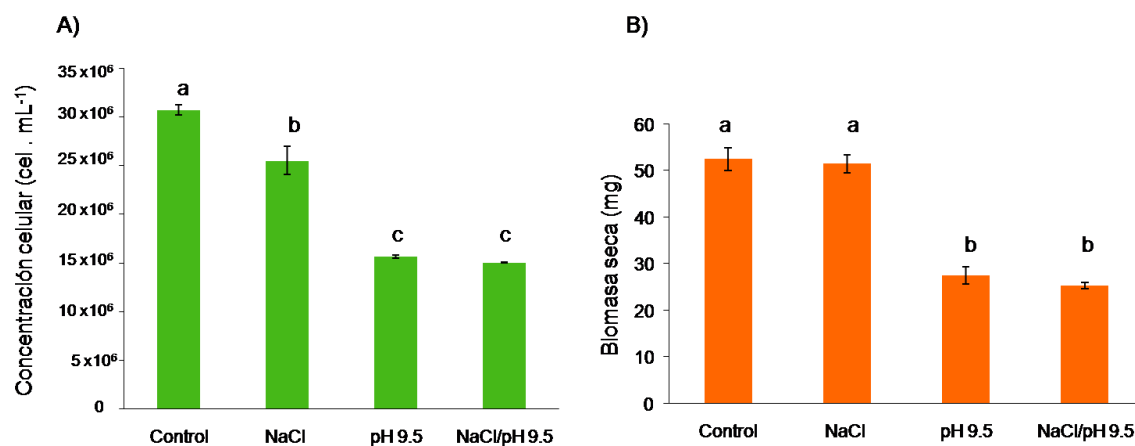


Figura 4.14. Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza n = 3).

En la figura 4.14 B, se presenta la acumulación de biomasa seca de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control, en los que se observa que los cultivos con tratamiento de NaCl presentaron una acumulación de biomasa seca de 51.46 mg, la cual es estadísticamente igual a los 52.43 mg acumulados en el control. Aunque la concentración celular indica que los cultivos con tratamiento NaCl se obtuvo una cantidad de células menor en comparación con el control, las células de los cultivos con tratamiento de NaCl resultaron ser más pesadas, y esto quizá se deba a que acumularon una mayor cantidad de metabolitos. De los tratamientos de pH 9.5 y NaCl/pH 9.5, en el que el pH de medio de cultivo se cambió, se obtuvo la menor acumulación de biomasa y estadísticamente igual de 27.53 g y 25.3 mg respectivamente, lo cual coincide con el hecho de los cultivos con esos mismos tratamientos presentaron un menor número de células.

4.3.5.2 Efecto en la acumulación de lípidos.

Como resultado de la extracción con solventes [33] se obtuvieron lípidos y otros compuestos como pigmentos presentes en las células. Aunque algunos autores que han utilizado la mezcla de solventes cloroformo/metanol nombran como lípido total obtenido al producto de la extracción realizada con este solvente [30,33], en este trabajo se optó por denominarlo como extracto crudo. En la figura 4.15 A, se presentan los valores promedio del extracto crudo obtenido de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control. Los cultivos sometidos a tratamiento de NaCl produjeron una cantidad de extracto crudo 18.8 mg estadísticamente igual a los 19.96 mg obtenidos de los cultivos control. Por otro lado, los cultivos con tratamiento de pH 9.5 y NaCl/pH 9.5, en el que el pH se cambió, presentaron una acumulación de biomasa estadísticamente igual de 13.76 mg y 16.3 mg respectivamente. En la figura 4.14 B, se presenta el promedio del porcentaje de extracto crudo (con respecto a la biomasa seca), de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos. De estos se obtuvo 38.02% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento control, 36.54% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de NaCl, 49.95% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de pH 9.5 y 64.63% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de NaCl/pH 9.5. Como se puede observar entre los porcentajes de extracto obtenidos de los cultivos Control, NaCl y pH 9.5 no hay

una diferencia significativa, y entre los extractos obtenidos de los cultivos con tratamiento de pH 9.5 y NaCl/pH 9.5 no hay una diferencia significativa estadísticamente.

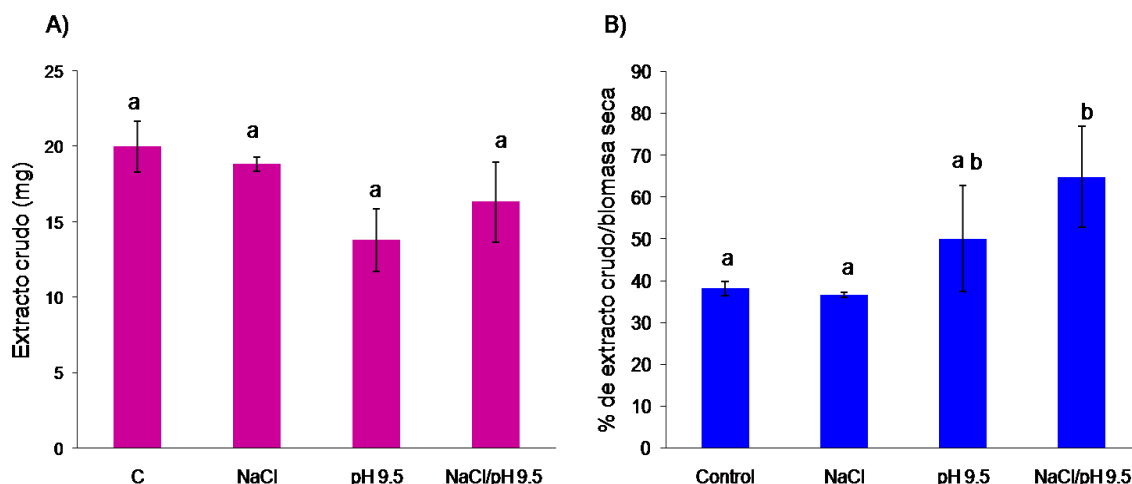


Figura 4.15. Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

Los extractos crudos de todas las muestras fueron transesterificados y analizados por cromatografía de gases (GC) como se describió previamente, y se calculó el porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto y a la biomasa seca, (Tabla 4.2 y Figura 4.16).

Los cultivos del tratamiento de NaCl presentaron una mayor acumulación de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo y a la biomasa seca, obteniéndose porcentajes con respecto al extracto crudo de éster metílico del ácido hexadecanoico de 4.24%, éster metílico del ácido octadecanoico de 0.13%, éster metílico del ácido octadecenoico (cis) de 26.80% y éster metílico del ácido graso octadecenoico (trans) de 1.46%. Los porcentajes con respecto a la biomasa seca fueron: de éster metílico del ácido hexadecanoico de 1.55%, éster metílico del ácido octadecanoico de 0.04%, éster metílico del ácido octadecenoico (cis) de 9.79% y éster metílico del ácido octadecenoico (trans) de 0.53%. Por otra parte, en la tabla 4.2 y la figura 4.15, graficas C y D, se puede observar el porcentaje total de ésteres metílicos (suma de los porcentajes individuales de los metil ésteres) en relación al extracto crudo y a la biomasa seca, respectivamente; con lo que se tiene que con el tratamiento de estrés por NaCl se obtuvo una mayor cantidad de metil

ésteres 32.64% con respecto al extracto crudo y 11.93% con respecto a la biomasa seca. Sin embargo, con respecto a la biomasa seca el tratamiento de NaCl, el de pH 9.5 y de NaCl/pH9.5 no presentan diferencias significativas (figura 4.15, grafica D), Las diferencias significativas entre estos mismos tratamientos que se obtuvieron con respecto al extracto crudo, indica que en el extracto del tratamiento NaCl había una mayor cantidad de triglicéridos que después de la transesterificación se transformaron en metil ésteres (Figura 4.15, grafica D), y por lo tanto el porcentaje obtenido de ésteres metílicos con respecto al extracto resuelta ser mayor.

Tabla 4.2. Variación de ésteres metílicos obtenidos de *C. sacharophila* en respuesta a estrés por pH alcalino 9.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos.

Tratamientos	Ésteres metílicos (%)				Ésteres metílicos totales (%) ¹
	C-16	C-18	C-18:1 cis	C-18:1 trans	
Respecto a extracto					
Control	2.57 ± 0.21	0.54 ± 0.19	12.71 ± 3.59	1.10 ± 0.09	16.94 ± 1.88 a
NaCl	4.24 ± 0.10	0.13 ± 0.003	26.80 ± 0.67	1.46 ± 0.03	32.64 ± 0.82 b
pH 9.5	3.36 ± 1.4	0.35 ± 0.13	26.29 ± 7.04	0.85 ± 0.28	20.60 ± 8.49 a
NaCl/pH 9.5	2.79 ± 0.53	0.37 ± 0.17	14.65 ± 2.27	0.88 ± 0.30	18.71 ± 0.90 a
Respecto a biomasa seca					
Control	0.97 ± 0.05	0.20 ± 0.07	4.81 ± 1.21	0.41 ± 0.01	6.42 ± 0.31 a
NaCl	1.55 ± 0.05	0.04 ± 0.001	9.79 ± 0.36	0.53 ± 0.019	11.93 ± 0.44 b
pH 9.5	1.87 ± 1.41	0.19 ± 0.14	9.10 ± 6.98	0.26 ± 0.07	11.43 ± 1.91 b
NaCl/pH 9.5	1.72 ± 0.41	0.21 ± 0.02	9.07 ± 2.21	0.51 ± 0.01	11.52 ± 0.12 b

¹Porcentajes ± SD de tres réplicas. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza).

Estos resultados son muy interesantes, ya que los de peso seco, concentración celular y extracto crudo obtenido de los cultivos, indicaron que los cultivos con tratamiento de estrés en algunos casos acumularon menos biomasa y menos extracto crudo. Las graficas de la figura 4.15 nos indican que de los lípidos procedentes de los cultivos con tratamiento de estrés por NaCl, pH 9.5 y NaCl/pH 9.5 se obtuvo una mayor cantidad de ésteres metílicos y por tanto debe haber una mayor presencia de triglicéridos en los extractos crudos, siendo los ésteres metílicos producidos a partir de los lípidos obtenidos de cultivos con tratamiento de NaCl los de mayor porcentaje. Lo anterior se puede interpretar como que a pesar de haber obtenido una menor cantidad de extracto crudo a partir de los cultivos con tratamiento de estrés, estos están formados por una mayor

cantidad de triglicéridos a diferencia de los cultivos control. Esto resulta interesante, ya que esta diferencia quizá podría deberse a que este tratamiento de estrés con NaCl produjo un aumento de glicerol, el cual es precursor de la síntesis de triglicéridos [6], lo que resultó en una mayor cantidad de ésteres metílicos en comparación con los otros tratamientos. Por otra parte resulta importante destacar que *C. sacharophila* produce en su mayoría ácidos grasos que se consideran adecuados para la producción de biodiesel C-18:1[69, 70].

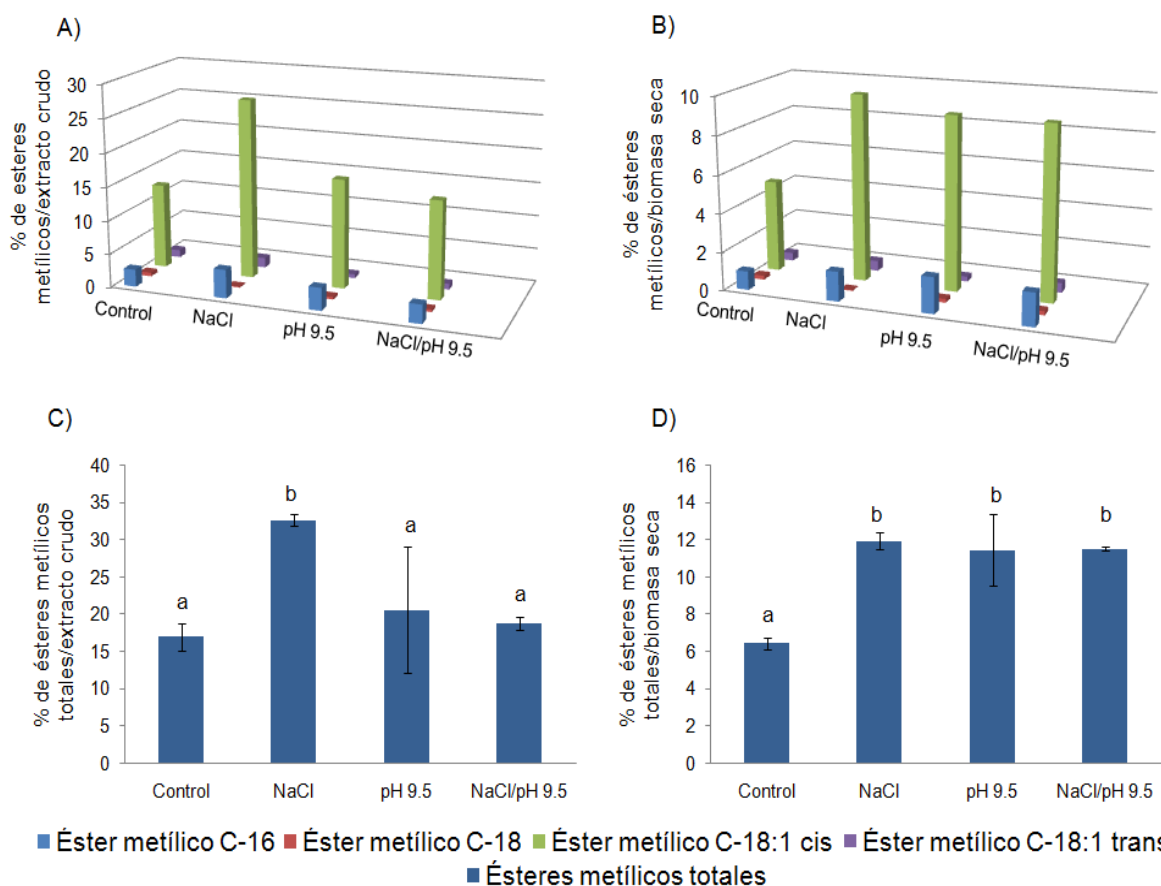


Figura 4.16. Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

4.3.5.3 Comparación del efecto de los tratamientos de estrés en la producción de ésteres metílicos totales.

Se evaluó la cantidad de ésteres metílicos totales de *C. saccharophila* bajo estrés por pH alcalino 9.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos. Como se puede observar en la figura 4.17, la mayor cantidad de ésteres metílicos totales se obtuvo con el tratamiento NaCl en el que se acumularon 6.13 mg, y este tratamiento fue significativamente diferente a todos los demás. Con el tratamiento pH 9.5 se obtuvieron 3.14 mg, mientras que con el tratamiento NaCl/pH 9.5 se obtuvieron 2.90 mg; estos tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos, ni con respecto al control en el que se obtuvieron 3.38 mg. Por otra parte, cabe recordar que con el tratamiento NaCl se obtienen ésteres metílicos de buena calidad, ya que los ésteres metílicos provenían en su mayoría de triglicéridos formados de ácidos grasos C-18:1, y este se encuentra entre los preferidos para la producción de ésteres metílicos (biodiesel) [69,70]. Estos resultados sugieren que mientras el estrés por 150mM de NaCl promueve un aumento en la cantidad de ésteres metílicos que pueden obtenerse a partir del cultivo de la microalga *C. saccharophila*, los tratamientos con pH 9.5 mostraron resultados negativos tanto para la acumulación de biomasa como para la obtención de ésteres metílicos a partir del cultivo de esta microalga.

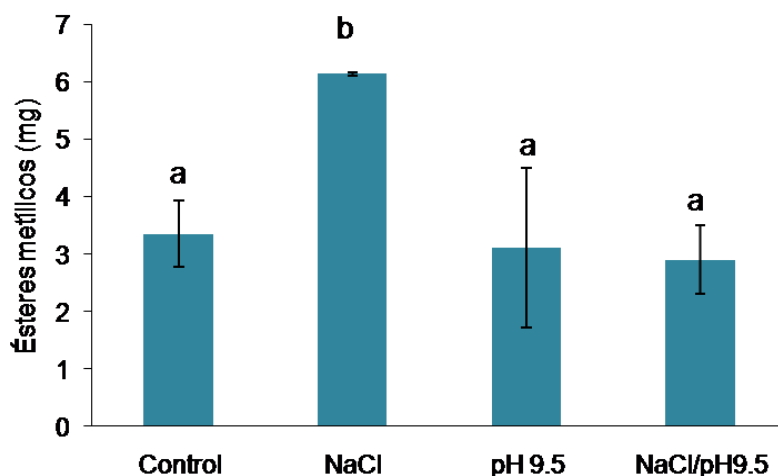


Figura 4.17. Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino (10.5). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3).

4.3.6 Efecto del estrés por pH 10.5, y la combinación con estrés osmótico por en el cultivo de *C. saccharophila*.

4.3.6.1 Efecto en la acumulación de biomasa

En la figura 4.18, se pueden observar los cultivos sometidos a estrés con los tratamientos de NaCl, pH 10.5 y NaCl/pH10.5, así como el control. Los cultivos con tratamiento de pH 10.5 y NaCl/pH 10.5, en el que se cambió el pH del medio de cultivo, visualmente presentaron una coloración menos intensa que el control. Por su parte, los cultivos con tratamiento de NaCl, en el que el pH de medio no se cambió, visualmente presentaron una coloración similar a la de control, lo cual sugiere que la diferencia de coloración puede deberse al estrés por pH alcalino (10.5). Por otra parte, en la figura 4.18 se presentan imágenes de las células de *C. saccharophila* al microscopio óptico a 40X, en el que se puede observar que la células de estos cultivos presentan un tamaño similar.

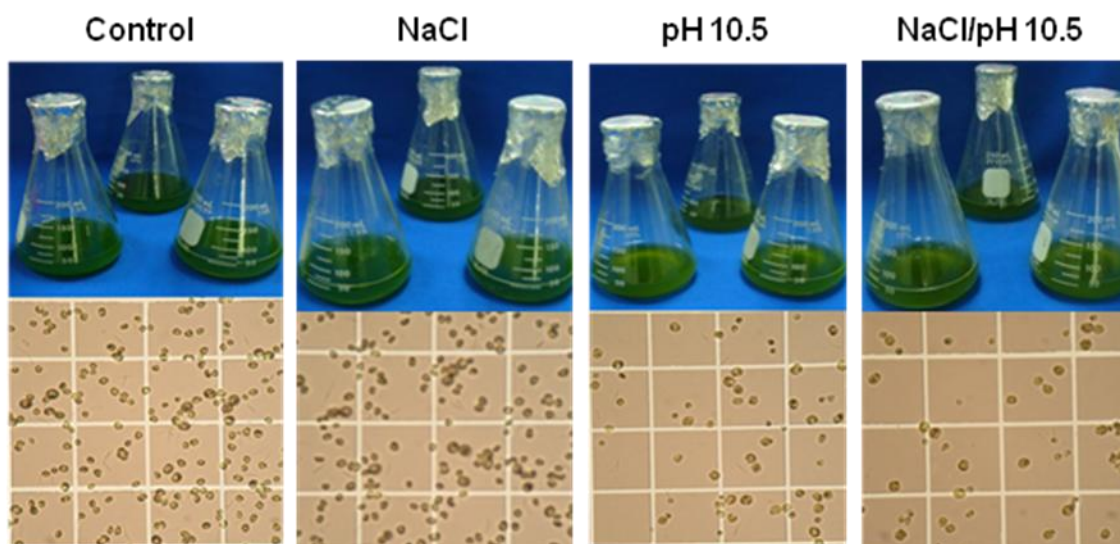


Figura 4.18. Cultivos de *C. saccharophilai*, en matraces con 50 mL de TAP, y células de estos cultivos observadas al microscopio óptico a 40X al final del experimento (día 13), con los diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino.

En la figura 4.19 A, se presenta la concentración celular de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control, en el que se observa que con el tratamiento de NaCl se presentó una disminución del células obteniéndose $34.2 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, a diferencia de las $38.8 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ presentes en el control. Con los tratamientos de pH 10.5 y

NaCl/pH10.5 se obtuvo la mayor disminución en concentración celular con respecto a los otros tratamientos, con $12.4 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $11.32 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Esto sugiere que al igual que con la disminución de la coloración en los cultivos, esta disminución de células puede deberse al estrés por pH alcalino (10.5). En estudios previos como el de Guckert y Cooksey [47] se ha reportado que el aumento del pH provoca la inhibición de la actividad fotosintético y del ciclo de división celular, lo cual ocasiona una disminución en el número de células presentes en los cultivos. Por otra parte en los cultivos con tratamiento de NaCl en los que no se observó una disminución de la coloración, quizá la fotosíntesis y crecimiento celular se inhibieron momentáneamente, pero como después del estrés osmótico, las células fueron resuspendidas en medio TAP sin ninguna modificación, las células posiblemente se recuperaron del estrés. León y Galván [65], mencionan que la microalga *C. reinhardtii* presenta una inhibición del crecimiento celular y de la fotosíntesis en condiciones de estrés osmótico, como también lo mencionan otros autores [40, 41, 42] cuando se utilizan concentraciones de NaCl de 100 hasta 200mM, pero después de que el glicerol, metabolito que actúa como un osmorregulador, es excretado al medio por la microalga, por lo cual ya no hay estrés osmótico, la células se recuperan y dejan de presentar inhibición del crecimiento celular y de la fotosíntesis. Aunque en este caso no se trata de *C. reinhardtii*, pero si de una microalga verde, pudiese ser que esté pasando lo que León y Galván [62] observaron para la microalga verde *C. reinhardtii*.

En la figura 4.19 B, se presentan los resultados de la acumulación de biomasa seca de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control. Se observa que los cultivos con tratamiento de NaCl presentaron una acumulación de biomasa seca de 52.18 mg, la cual es estadísticamente igual 54.65 mg acumulados en el control. Aunque la concentración celular indica que los cultivos con tratamiento NaCl se obtuvo una cantidad de células menor en comparación con el control, las células de los cultivos con tratamiento de NaCl resultaron ser más pesadas, y esto quizá se deba a que acumularon una mayor cantidad de metabolitos. De los cultivos con tratamiento de pH 10.5 y NaCl/pH10.5, en el que se cambió el pH de medio de cultivo, se obtuvo la menor acumulación de biomasa seca y estadísticamente igual de 23.65 g y 23.08 mg respectivamente, lo cual coincide con el hecho de que los cultivos con esos mismos tratamientos presentaron un menor número de células.

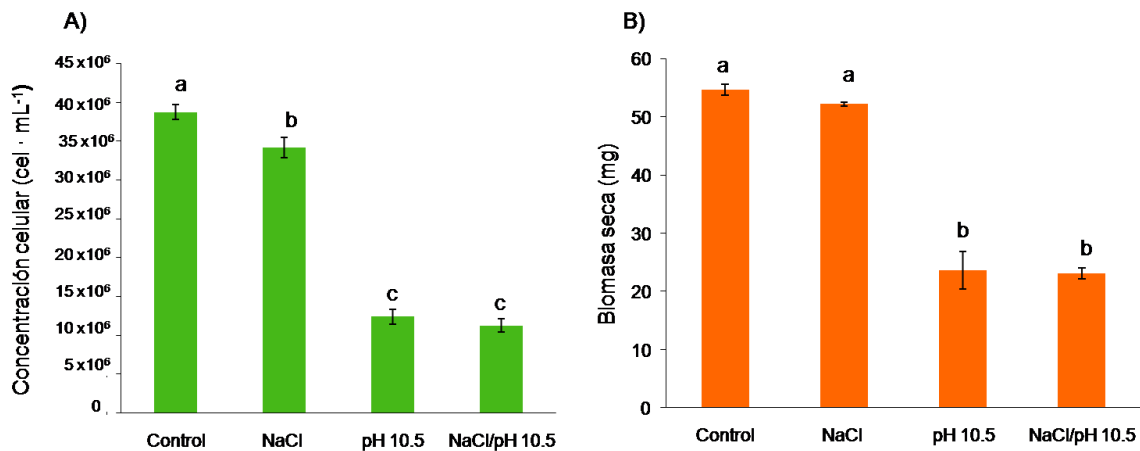


Figura 4.19. Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

4.3.6.2 Efecto en la acumulación de lípidos.

Como resultado de la extracción con solventes [33] se obtuvieron lípidos y otros compuestos como pigmentos presentes en las células, y aunque algunos autores que han utilizando la mezcla solvente cloroformo/metanol nombran como lípido total obtenido al producto de la extracción realizada con este solvente [30,33], en este trabajo se optó por denominarlo como extracto crudo. En la figura 4.20 A, se presentan los valores promedio del extracto crudo obtenido de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos y el control. Con los cultivos sometidos a tratamiento de NaCl se obtuvo una cantidad de extracto crudo de 28.6 mg obteniéndose diferencias no significativas respecto al control. Por otro lado, los cultivos con tratamiento de pH 10.5 y NaCl/pH 10.5, en el que el pH se cambió, presentaron una acumulación de extracto crudo estadísticamente igual de 11.5 mg y 11.7 mg respectivamente, menor al control, lo que podría deberse a que presentaron la menor acumulación de biomasa seca (figura 4.19 B). En la figura 4.20 B, se presenta el promedio del porcentaje de extracto crudo (con respecto a la biomasa seca), de los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos, un 52.34% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento control, un 46.7% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de NaCl, un 50.38 % de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de pH 10.5 y un 51.07% de la biomasa seca de los cultivos con tratamiento de NaCl/pH 10.5.

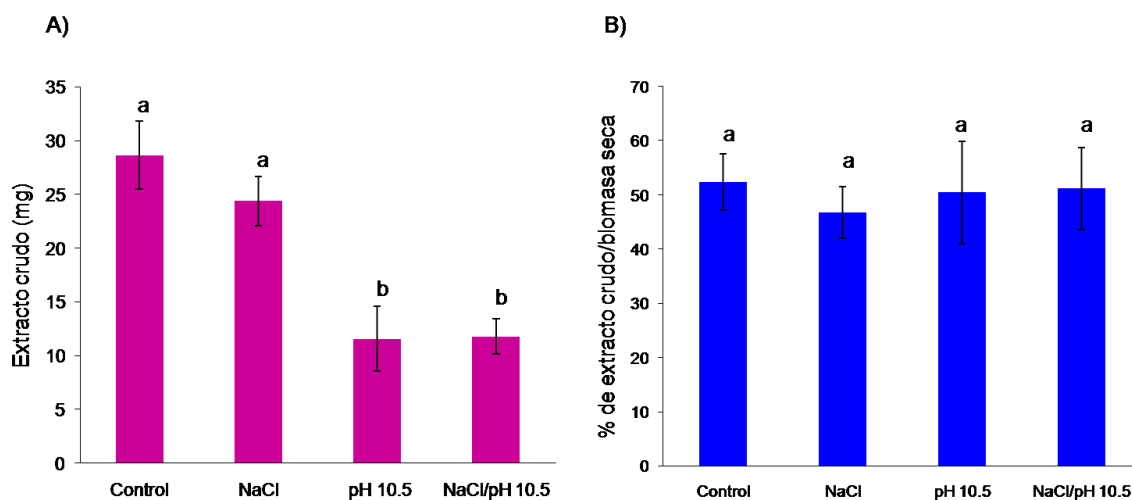


Figura 4.20. Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

Los extractos crudos de todas las muestras fueron transesterificados y analizados por cromatografía de gases (GC) como se describió previamente y se calculó el porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto y a la biomasa seca, (Tabla 4.3 y Figura 4.21).

Tabla 4.3. Variación de ésteres metílicos obtenidos de *C. saccharophila* en respuesta a estrés por pH alcalino 10.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos tratamientos.

Tratamientos	Ésteres metílicos (%)				Ésteres Metílicos totales (%) ¹ .
	C-16	C-18	C-18:1 cis	C-18:1 trans	
Respecto a extracto					
Control	1.59 ± 0.16	0.48 ± 0.19	8.20 ± 1.18	1.15 ± 0.14	11.43 ± 1.07 a
NaCl	3.23 ± 1.01	0.41 ± 0.26	29.73 ± 2.10	0.82 ± 0.30	25.21 ± 1.00 b
pH 10.5	2.1 ± 0.86	0.19 ± 0.01	8.33 ± 1.64	1.21 ± 0.06	11.92 ± 2.53 a
NaCl/pH 10.5	3.28 ± 0.72	0.65 ± 0.30	14.21 ± 1.9	0.61 ± 0.08	18.76 ± 2.24 c
Respecto a biomasa seca					
Control	0.80 ± 0.05	0.25 ± 0.12	4.23 ± 1.08	0.58 ± 0.02	5.87 ± 0.38 a
NaCl	1.28 ± 0.03	0.15 ± 0.07	8.26 ± 0.25	0.32 ± 0.02	10.02 ± 0.36 b
pH 10.5	1.07 ± 0.38	0.09 ± 0.004	4.14 ± 0.64	0.60 ± 0.02	5.92 ± 1.02 a
NaCl/pH 10.5	1.16 ± 0.25	0.23 ± 0.11	5.07 ± 0.97	0.21 ± 0.03	6.69 ± 1.05 a

¹ Porcentajes ± SD de tres réplicas. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza).

El cultivo del tratamiento de NaCl presentó una mayor acumulación de ésteres metílicos respecto al extracto crudo y a la biomasa seca, presentando porcentajes con respecto al extracto crudo de éster metílico del ácido graso hexadecanoico de 3.23%, éster metílico del ácido graso octadecanoico de 0.41%, éster metílico del ácido graso octadecenoico (cis) de 20.73% y éster metílico del ácido graso (trans) de 0.82%. Los porcentajes de on respecto a la biomasa seca fueron: de éster metílico del ácido graso hexadecanoico de 1.28%, éster metílico del ácido graso octadecanoico de 0.15%, éster metílico del ácido graso octadecenoico (cis) de 8.26% y éster metílico del ácido graso octadecenoico (trans) de 0.32 %, con respecto a la biomasa seca. Por otra parte, en la tabla 4.3 y la figura 4.19, graficas C y D, se puede observar el porcentaje total de metil ésteres (suma de los porcentajes individuales de los metil ésteres) en relación al extracto crudo y a la biomasa seca, respectivamente; con lo que se tiene que con el tratamiento de estrés por NaCl se obtuvo una mayor cantidad de ésteres metílicos 25.21% con respecto al extracto y 10.02% con respecto a la biomasa seca, en comparación a los tratamientos.

Estos resultados son muy interesantes, ya que el peso seco, concentración celular y extracto obtenidos de los cultivos, indicaron que con el tratamiento de estrés en algunos casos se acumuló menos biomasa y menos extracto crudo. Las graficas de la figura 4.21 indican que de los lípidos procedentes de los cultivos con tratamiento de estrés por NaCl, pH 10.5 y NaCl con pH 10.5 obtuvo una mayor cantidad de ésteres metílicos, y por tanto debe haber una mayor presencia de triglicéridos en los extractos crudos, siendo los ésteres metílicos producido a partir de los lípidos obtenidos de cultivos con tratamiento de NaCl el del mayor porcentaje. Lo anterior se interpreta como que a pesar de haber obtenido una menor cantidad de extracto crudo a partir de los cultivos con tratamiento de estrés, estos están formados por una mayor cantidad de triglicéridos a diferencia de los cultivos control. Esto resulta interesante, ya que esta diferencia quizá podría deberse a que este tratamiento de estrés con NaCl produjo un aumento de glicerol, el cual es precursor de la síntesis de triglicéridos [6], lo que resultó en una mayor cantidad de ésteres metílicos en comparación con los otros tratamientos. Por otra parte resulta importante destacar que *C. sacharophila* produce en su mayoría ácidos grasos que se consideran adecuados para la producción de biodiesel C-18:1 [69, 70].

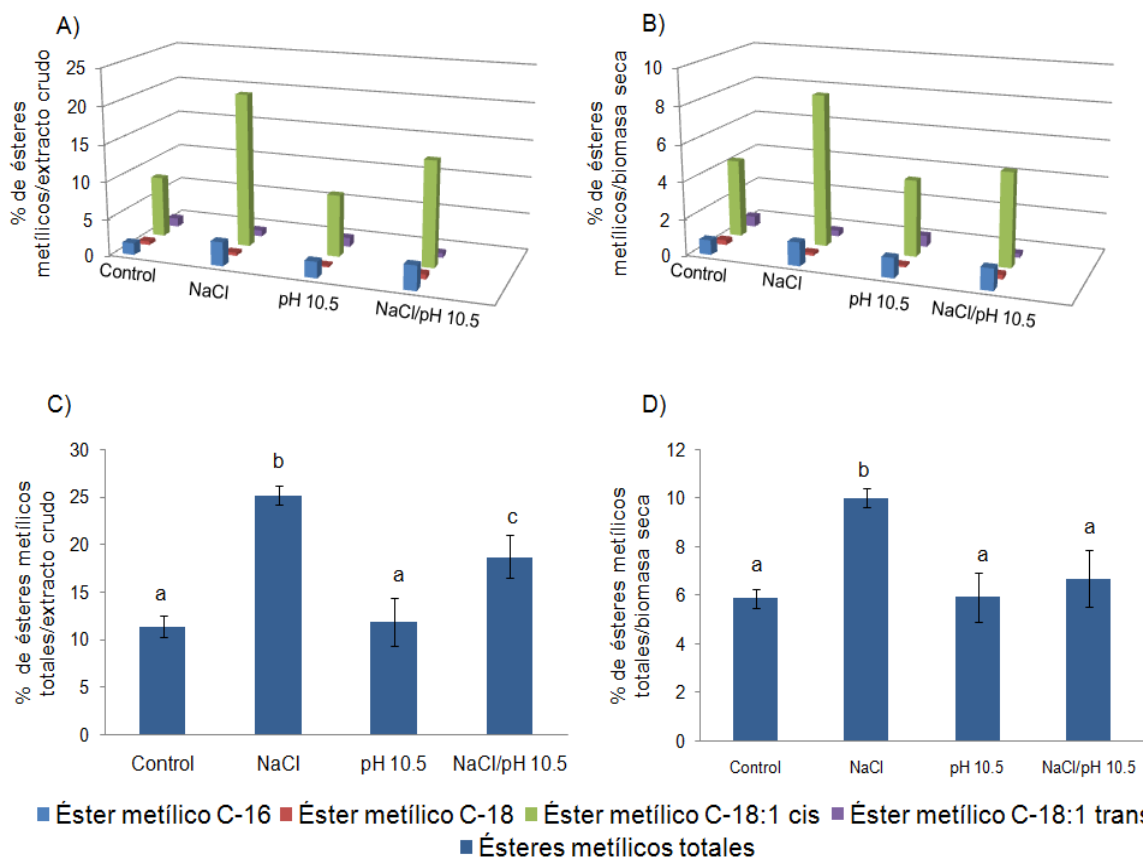


Figura 4. 21. Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

4.3.6.3 Comparación del efecto de los tratamientos de estrés en la producción de ésteres metílicos totales.

Se evaluó la cantidad de ésteres metílicos totales de *C. saccharophila* bajo estrés por pH alcalino 10.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de estos tratamientos. Como se puede observar en la figura 4.22, la mayor cantidad de ésteres metílicos totales se obtuvo a partir del tratamiento NaCl acumulando 6.14 mg, y este tratamiento fue significativamente diferente a todos los demás. Con el tratamiento de pH 10.5 se obtuvieron 6.14 mg, mientras que con el tratamiento de NaCl/pH 10.5 se obtuvieron 2.20 mg; estos tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos, ni con

respecto al control en el que se obtuvieron 3.27. Por otra parte del tratamiento de NaCl se obtienen ésteres metílico de buena calidad, ya que los ésteres metílicos provenían en su mayoría de triglicéridos formados de ácidos grasos C-18:1, y este se encuentra entre los preferidos para la producción de ésteres metílicos (biodiesel) [69,70], mientras que los tratamientos con pH 10.5 resultaron perjudiciales para la acumulación de ésteres metílicos.

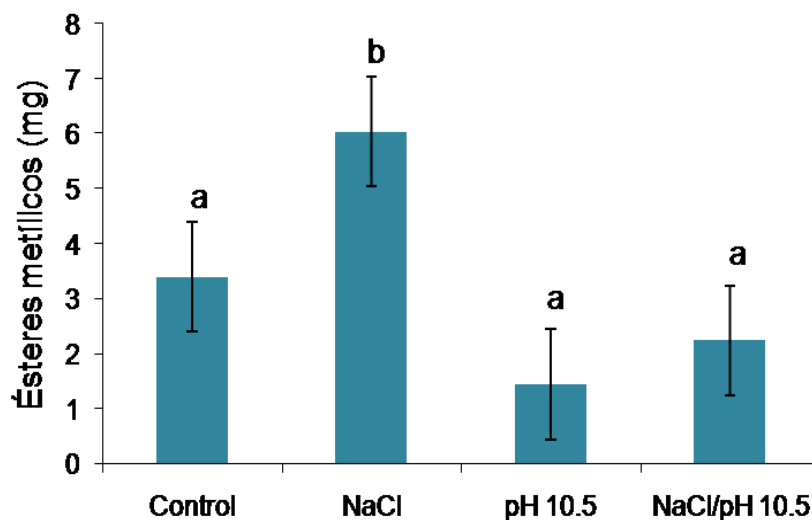


Figura 4. 22. Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino (10.5). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3).

4.4 Conclusiones

En este trabajo se determinó el medio más adecuado para el cultivo de la microalga verde *Chlorella saccharophila*, que resultó ser el medio Tris-Acetato –Fosfato (TAP), y que por lo tanto se utilizó en todos los experimentos descritos en este trabajo.

Se realizó la curva de crecimiento para *C. saccharophila*, y se determinó que el tiempo al cual se acumula la mayor concentración celular, fue al día 10 de cultivo, tiempo en el que termina su fase de crecimiento exponencial o se inicia la fase de crecimiento estacionaria. El día 10 del cultivo fue elegido aplicar iniciar los tratamientos de estrés.

Se detectaron cuatro ésteres metílicos de los extractos transesterificados de *C. saccharophila*: éster metílico del ácido hexadecanoico (C-16), éster metílico del ácido octadecanoico (C-18), y ésteres metílicos del ácido octadecenoico (C-18:1cis y C-18:1 trans).

Se observó una variación en la cantidad de ésteres metílicos totales en respuesta a los diferentes tratamientos de estrés. La mayor cantidad de ésteres metílicos totales se obtuvo con el tratamiento N, que corresponde al estrés por disminución de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo.

El estrés por pH alcalino 9.5 y 10.5 fue negativo tanto para la acumulación de biomasa como para la acumulación de ésteres metílicos a partir del cultivo de la microalga *C. saccharophila*.

Discusión general

En este trabajo se evaluó el perfil de ésteres metílicos obtenido a partir del cultivo de las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella saccharophila* bajo condiciones controladas de agitación, luz y temperatura. Los ésteres metílicos que se detectaron fueron: éster metílico del ácido hexadecanoico (C-16), éster metílico del ácido octadecanoico (C-18), éster metílico del ácido octadecenoico (C-18:1cis y C-18:1 trans) y éster metílico del ácido octadecadienoico (C-18:2). Este último no se detectó en los extractos transesterificados de *C. saccharophila*. Para ambas microalgas los ésteres metílicos de 18 carbonos estaban presentes en mayor porcentaje. En la literatura [66, 67] se ha mencionado que la presencia de ésteres metílicos de 16 y 18 carbonos, como los obtenidos para las dos microalgas estudiadas en este trabajo, proporciona características adecuadas para una buena calidad de biodiesel, debido a que son bastante estables desde el punto de vista químico y son buena fuente para biodiesel.

Para *C. reinhardtii* en condiciones normales de cultivo, se observó una proporción similar de C-16, C-18:1 cis y C-18:1 trans, así como C-18:2. Estas proporciones varían de acuerdo al tratamiento de estrés al que sean sometidos los cultivos y se observó que el estrés por pH 10.5 disminuyó drásticamente la presencia del C-18:1 trans.

Cabe señalar que en *C. saccharophila* los ésteres metílicos están compuestos preferentemente por C-18:1cis en condiciones normales y bajo los diferentes tratamientos de estrés se observó un aumento de este tipo de éster metílico, excepto en el tratamiento de estrés osmótico por NaCl cuando las células se colectaron a los siete días del tratamiento, en el que la proporción de C-16 y C-18:1 fue similar. Cabe señalar que cuando las células se colectaron a los dos días del tratamiento de estrés osmótico por NaCl, se observó una mayor proporción de C-18:1 similar al tratamiento de disminución de la fuente de nitrógeno.

Tanto *C. reinhardtii* como *C. saccharophila* presentaron un porcentaje de extracto crudo respecto a la biomasa seca aproximadamente del 50% aproximadamente, y si este dato lo tomáramos como lo han hecho otros autores [30, 33] es decir, como lípido total obtenido, éste porcentaje, nos indicaría que ambas especies de microalgas pueden considerarse

con un gran potencial como materia prima para la obtención de biodiesel. Como lo mencionan Chisti y Schenk [3, 5] en sus respectivos estudios, un extracto de microalgas con un 30% de lípidos con respecto a la biomasa seca podría cubrir la demanda mundial de petróleo. Sin embargo conscientes de que en la extracción con solventes no únicamente se extraen lípidos, este dato es preferible tomarlo con reservas.

A pesar de que los cultivos de ambas especies de microalgas presentaron un perfil adecuado de ésteres metílicos, el cultivo de *C. saccharophila* tuvo una capacidad de acumular tres veces más concentración celular, y dos veces más biomasa seca que el de *C. reinhardtii*. Con respecto a la acumulación de ésteres metílicos totales, con el cultivo de *C. saccharophila* se puede obtener de cuatro a cinco veces más acumulación que con el de *C. reinhardtii*. Por lo tanto, en este trabajo se sugiere a *C. saccharophila* como una alternativa viable como fuente de materia prima para la obtención de biodiesel a partir del cultivo de esta especie de microalga. Por otro lado, los avances que se obtengan con *C. reinhardtii* como modelo de estudio permitirían también realizar modificaciones genéticas en otras especie para incrementar aún más su potencial, como podría ser en el caso de *C. saccharophila*.

Conclusiones y Perspectivas

En este trabajo se realizó por primera vez el análisis del perfil de los ésteres metílicos de las especies de algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella saccharophila*, y su variación en respuesta a condiciones de estrés por: disminución en la fuente de nitrógeno, pH alcalino 9.5 ó 10.5, por estrés osmótico con NaCl, y la combinación de éstos con estrés osmótico con NaCl.

Tanto *C. reinhardtii* como *C. saccharophila* presentaron un perfil adecuado de ésteres metílicos, como el recomendado para el biodiesel de buena calidad.

Además, para ambas especies de microalgas, el estrés por disminución de la fuente de nitrógeno fue el tratamiento con el que se obtuvo la mayor cantidad de ésteres metílicos totales, particularmente de C-18:1cis.

Si el propósito fuera la producción de biodiesel a corto plazo, *C. saccharophila* se presenta como una nueva alternativa de materia prima con gran potencial, debido a que además de presentar un perfil de ésteres metílicos adecuado para este fin, presentó una buena capacidad de acumular biomasa y lípidos.

Por su parte los resultados obtenidos con *C. reinhardtii* confirman su potencial como modelo de estudio del metabolismo de lípidos, además de tener potencial de ser mejorada mediante manipulación genética con el fin de ser utilizada como materia prima para la producción de biocombustibles.

Bibliografía

1. Bravo E. Biocombustibles, Cultivos energéticos y soberanía alimentaria en Latino América. Encendiendo el debate sobre los biocombustibles. Manthra Editores. Quito Ecuador, 2007; Vol. 1, 1-151.
2. Canakci M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. *Bioresource Technology*. 98, 183–190, 2007.
3. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25, 294–306, 2007.
4. Hossain A. Salleh A. Nasrulhaq A. Chowdhunry P. Naquiddin M. Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 4, 250-254, 2008.
5. Schenk P. Thomas S. y Stephens E. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*. 1, 20–43, 2008.
6. Hu Q. Sommerfeld M. Jarvis E. Ghirarsi M. Posewitz M. Seibert M. y Darzins A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54: 621–639, 2008
7. Griffiths M. Harrison S. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species of biodiesel production. *Journal Applied Phycology*. 21, 493-507, 2009.
8. Beniston M. Climatic change: possible impacts on human health. *Swiss Medical Weekly* 32, 332–337, 2002.
9. Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. Cambio climático. IPCC. Ginebra, Suiza, 1-104, 2008. http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/syr/ar4_syr_sp.pdf.

10. Naciones Unidas. Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas Sobre el Cambio Climático. 1998
<<http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpspan.pdf>>.
11. Dewulf J. y Langenhove H. Renewables-Based Technology: Sustainability Assessment. Ed. John Wiley & Sons Ltd. Inglaterra, 2006, 1-337,
12. Akella A., Saini R., Sharma P. Social, economical and environmental impacts of renewable energy systems. *Renewable Energy*. 34, 390–396, 2009.
13. Del Río P., Burguillo M. An empirical analysis of the impact of renewable energy deployment on local sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 13, 1314–325, 2009.
14. S'rensen B., Petersen A., Juhl C., Ravn H., S'ndergren C., Simonsen P., J'rgensen K., Nielsen L., Larsen H., Morthorst P., Schleisner L., S'rensen F., Pedersen T. Hydrogen as an energy carrier: scenarios for future use of hydrogen in the danish energy system. *International Journal of Hydrogen Energy*. 29, 23 – 32, 2004.
15. Zaldivar J., Nielsen J. y Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology Biotechnology*. 56, 17–32, 2001.
16. Ley para el Aprovechamiento de Energías Renovables y el Financiamiento de la Transición Energética. Actualidad, Diario Oficial de la Federación Mexicana. 2008.
17. Ley de Promoción y Desarrollo de Bioenergéticos. Diario Oficial de la Federación Mexicana. 2008.
18. Demirbas A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*. 49, 2106-2116, 2008.

19. FAO. Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma, Italia. 2008, 1-145,
20. Karakashev D. Batstone D. y Angelidaki I. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and environmental microbiology*. 71, 331–338, 2005.
21. Claassen P. Van J. López A. van E. Sijtsma L. Stams J. Vries S. y Weusthuis R. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl Microbiol Biotechnol*. 52, 741-755, 1999.
22. Murugesan A. Umarani C. Sabramanian R. Nedunchezian N. Bio-diesel as an alternative fuel for diesel engines—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 653–662, 2009.
23. Leung D., Koo B., Guo Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. *Bioresource Technology*. 97, 250–256, 2006.
24. Fangrui M. y Hanna M. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*. 70, 1-15. 1999.
25. Schenk P. Thomas S. y Stephens E. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*. 1, 20–43, 2008.
26. Wijffels R. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 26, 26-31, 2008.
27. Lehninger A. L. *Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular*. (2a. Edición) Ed. Omega, Barcelona. 1978, 1069.
28. Ali Y. y Hanna M. Alternative diesel fuels from vegetable oil. *Bioresouce technology*. 50, 153-163, 1994.

29. Gerpen J., Shanks B. Pruszko R. Clements D. Knothe G. Biodiesel Production Technology. National Renewable Energy Laboratory.1-105, 2004.
30. Widjaja A., Chien C. y Ju Y. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 40, 13–20, 2009.
31. Illman A. Scragg A. y Shales S. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. Enzyme and Microbial Technology. 27, 631–635, 2000.
32. Ratledge C. y Cohen Z. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils. Lipid Technology. 20, 155-160, 2008.
33. Khan S. Rashmi, Hussain M., Prasad S., Banerjee U. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. Renew Sustainable Energy Reviews. doi:10.1016/j.rser.2009.04.005.
34. Ehimen E., Connaughton S., Sun Z. y Carrington G. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass. Bioenergy. 1, 371–381, 2009.
35. Singh A. Singh D. Murphy J. Mechanism and challenges in comercialisation of alga biofuel. Bioresource Technology. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.057.
36. Weissman JC, Tillett DM. Aquatic Species Project Report; NREL/MP-232-4174. In: Brown LM, Sprague S (eds) National Renewable Energy Laboratory. 1992,41–58.
37. Kurano N, Ikemoto H, Miyashita H. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. Energy Convers Manag. 36, 689–692, 1995.
38. Ohlrogge, J. and Browse, J. Lipid biosynthesis. Plant Cell. 7,957–970, 1995.

39. Jaworski, J. Clough, R. Barnum, S. A cerulenin insensitive short chain 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase in *Spinacia oleracea* leaves. *Plant Physiology*. 90, 41-44, 1989.
40. Cruz J. Salvilla B. Kanazawa A. y Kramer D. Inhibition of plastocyanin to P_{700}^{+} Electro transfer in *chlamydomonas reinhardtii* by hyperosmotic stress. *Plant Pysiology*. 127, 1167-1179, 2001.
41. Ahmando I. y Hellebust J. The role of glicerol and inorganic ions in osmoregulatory responses of the Euryhaline flagellate *Chamydomonas pulsatilla* wollen weber. *Plant Pysiology*. 82,406-410, 1986.
42. Husic D. y Tolbert N. Effect of osmotic stress on carbon metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 82, 549-596, 1986.
43. Takagi M., Karseno y Yoshida Y. Efecct of salt concentration on intracelular acumulation of lípidos ond trugliceridos in marine microalgae *Dunaliella* cell. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101, 223-226, 2006.
44. Da Silva A. Lourenco S. Chaloub R. effects of nitrogen starvation of the photosynthetic physiology of a tropical marine microalgae *Rodamonas* sp. (cryptophyceae). *Aquatic Botany*. 91, 291-297, 2009.
45. Zhila N. Kalacheva G. Volova T. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of tha green alga *Botryococcus*. *Journal Applied Phycology*.
46. Dean A. Sigee D. Estrada B. Pittman J. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*. doi: 10.14499-4507.2010.
47. Gucker J. y Cooksey K. Trigliceride acumulation and fatty acid profile changes in *Chorella* (Chlorophyta) during high pH induced cell cycle. *Jurnal of Phycology*. 26, 72-79, 1990.

48. Harris E. *Chlamydomonas* as a model organism. Annual Reviews. 52, 363-406, 2001.
49. Harris E. Introduction to *Chlamydomonas*. Chapter 1. Introduction to *Chlamydomonas*. Ed. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 1998, 1-11.
50. Trémolières A. Chapter 21. Glycerolipids: Composition, Biosynthesis and Function in *Chlamydomonas*. Ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1998, 415–431.
51. Morowvat M. Rasoul-Amini S. Ghasemi Y. *Chlamydomonas* as a “new” organism for biodiesel production. Bioresource Technology. doi:10.1016/j.biortech.2009.11.032.
52. Merchant S., Prochnick S., Vallon O., Harris E., Karpowicz S., Witman G., Terry A., Salamov A., Fritz-Laylin L., Maréchal-DRuard L., Marshall W., Qu L., Nelson D., Sanderfoot A., Spalding M., Katonov V., Ren Q., Ferris P., Lindquist E., Shapiro H., Lucas S., Grimwood J. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science. 318, 245-251, 2007.
53. Tatsuzawa H., Takizawa E., Wada M. y Yamamoto Y. Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas* Sp. Journal Phycology. 32, 598-601, 1996.
54. Moronta R., Mora. R. y Morales E. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. Revista de facultad de agronomía. 23, 28-43, 2006.
55. Jensf E. Rachlin J, Vandana J. y Warkentine B. An X-RAY energy dispersive study of cellular compartmentalization of lead and zinc in *Chlorella saccharophila* (Chlorophyta), *Navicula incerta* and *Nitzschia closterium* (Bacillariophyta). Environmental and Experimental Botany. 22, 319-328, 1982.

56. Göbel E. y Aach H. Studies of *Chlorella protoplasts*. II. Isolation and fusion of protoplasts from *Chlorella saccharophila* (Krüger) Nadson strain 211-1^a. *Plant Science*. 39, 213—218, 1985.
57. Takeda H. Classification of *Chlorella* strains by cell wall sugar composition. *Phytochemistry*. 27, 3823-3826, 1988.
58. Miao X. y Wu Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*. 97, 841–846, 2006.
59. Cleber F. Sant'Anna E. Villela da Costa M. Barcelos J. Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *Grasas y Aceites*. 57, 270-274, 2006.
60. Gorman D. y Levine R.. Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamidomonas reinhartii*. *Proceedings of Natural Academy of Sciences*. 54, 1665-1669, 1965.
61. Nichols H. Growth media – freshwater. In Stein, J. (Ed.) *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge University Press. 1973, 7-24.
62. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriological Reviews*. 35, 171-205, 1971.
63. Hansen P. Use of a Hemacytometer. Dept of Animal Sciences, University of Florida, 2000.
64. Siddharth J. Sharma M. Prospects of biodiesel from *Jatropha* in India: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 763-771, 2010.

65. Leon R. Galván F. Halotolerance studies on *Chlamydomonas reinhardtii*: glycerol excretion by free and immobilized cells. *Journal of Applied Phycology*. 6, 13-20, 1994.
66. Ingraham J. Ingraham C. *Introducción a la microbiología*. Ed. Reverte S.A. Barcelona 1998, 751.
67. Hema R. Santhil S. Shivakumar S. Chandrasekhara P. Udayakumar M. *Chlamydomonas reinhardtii*, a model system for functional validation of abiotic stress responsive genes. *Planta*. 226, 655–670, 2007.
68. Admiraal W. Peletier H. Laane R. Nitrogen metabolism of marine planktonic diatoms; excretion, assimilation and cellular pools of free amino acids in seven species with different cell size. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 98, 241-263, 1998.
69. Xu H., Miao X. Wu Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*. 126, 499–507, 2006.
70. Gouveia A. Oliveira C. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. doi: 10.1007/s10295-008-0495-6.

Apéndice A. Formulaciones de los medios de cultivo

Tabla A. 1 Medio de cultivo TAP

Soluciones stock	Para 1 L
1 M tris base	20 mL
Buffer de fosfato II	1 mL
Metales traza de Hutner	1 mL
Solución A	10 mL
Ácido acético glacial (pH 7.0)	1 mL

Tabla A.2 Soluciones stock (medio TAP)

Buffer de Fosfato II		Solución de metales traza de Hutner	
Componentes	Para 100 ml	Componentes	Para 500 ml
K_2HPO_4	10.8 g	BO_3H_3	5.7 g
KH_2PO_4	5.6 g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	11 g
Solución A		$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	2.53 g
Componentes	Para 500 ml	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.495 g
NH_4Cl	20 g	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.085 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.785 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.5 g	$Mo_7O_{24}(NH_4)_6 \cdot 4H_2O$	0.5 g

Tabla A. 3. Medio BB

soluciones stock	para 1L
Solución 1	10 ml
Solución 2	10 ml
Solución 3	10 ml
Solución 4	10 ml
Solución 5	10 ml
Solución 6	10 ml
Solución 7	1 ml
Solución 8	1 ml
Solución 9	1ml
Solución 10	1 ml

Tabla A.4. Soluciones stock, para 1L (medio BB)

solucion 1		EDTA	50.0 g
NaNO ₃	25.0 g	KOH	31.0g
solución 2		solución 8	
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.5g	FeSO ₄ .7H ₂ O	4.98 g
solución 3		H ₂ SO ₄	1.0 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	7.5 g	solución 9	
solución 4		H ₃ BO ₃	11.42 g
K ₂ HPO ₄	7.5 g	solución 10 (micronutrientes)	
solución 5		ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.82 g
KH ₂ PO ₄	17.5 g	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.44 g
solución 6		MoO ₇ O ₂ (NH ₄) ₆ *4H ₂ O	0.86 g
NaCl	2.5 g	CuSO ₄ *5H ₂ O	1.57 g
solución 7		COCl ₂ *6H ₂ O	0.39g

Tabla A.5. Medio Fitzgerald

Soluciones stock	Para 1 L
IBI(a)	1 mL
IBI(b)	1 mL
IBI(c)	1 mL
IBI(D)	1 mL
IBI(e)	1 mL

Tabla A.6. Soluciones stock medio Fitzgerald

Componente	Para 200 mL	Componente	Para 200 mL
IBI(a)		EDTA ferric sodium salt	1.86g
NaNO ₃	85.0 g	IBI(e)	
CaCl ₂ *2H ₂ O	3.70 g	H ₃ BO ₃	0.620 g
IBI(b)		MnSO ₄ *H ₂ O	0.34 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	24.648 g	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.057 g
IBI (c)		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	0.018 g
KH ₂ PO ₄	1.36 g	CoCl ₂ *6H ₂ O	0.027 g
K ₂ HPO ₄	8.70 g	KI	0.17 g
IBI(d)		CuSO ₄ *5H ₂ O	0.00004 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	1.392 g	H ₂ SO ₄	0.56 mL

Tabla A. 7. Medio BG11

soluciones stock	para 1L
Solución 1	10 ml
Solución 2	10 ml
Solución 3	10 ml
Solución 4	10 ml
Solución 5	10 ml
Solución 6	10 ml
Solución 7	10 ml
Solución 8	1 ml

Tabla A.8 Soluciones stock medio BG11

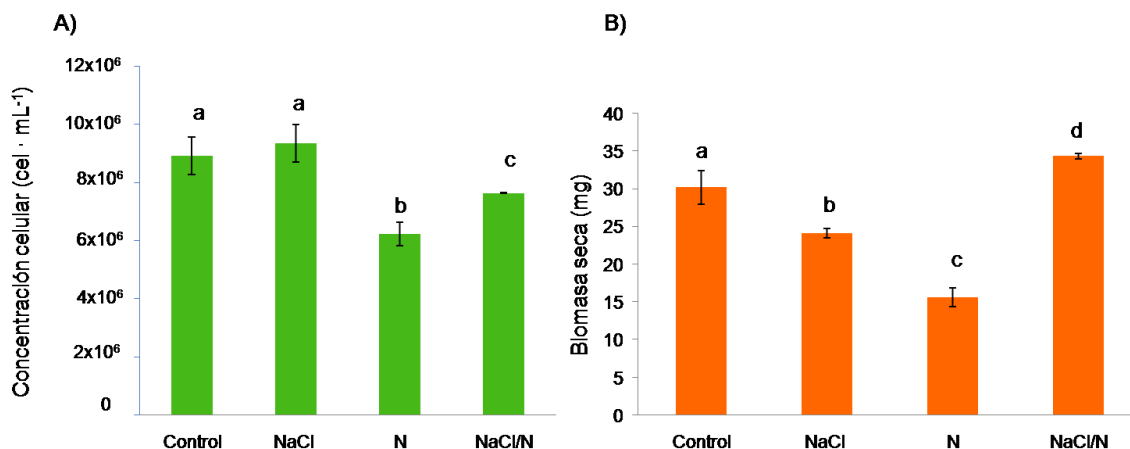
Componente	Para 100mL	Componente	para 100mL
solución 1		solución 6	
NaNO ₃	15.0 g	EDTA	0.01 g
solución 2		solución 7	
K ₂ HPO ₄	0.35 g	Na ₂ CO ₃	0.2g
solución 3		solución 8 (micronutrientos)	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.75 g	H ₃ BO ₃	6.1 g
solución 4		ZnSO ₄ .7H ₂ O	28.7g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.36g	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.44 g
solución 5		MoO ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ *4H ₂ O	1.25g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.59 g	CuSO ₄ *5H ₂ O	0.25 g

Apéndice B. Formulación del Yoduro de Iugol.

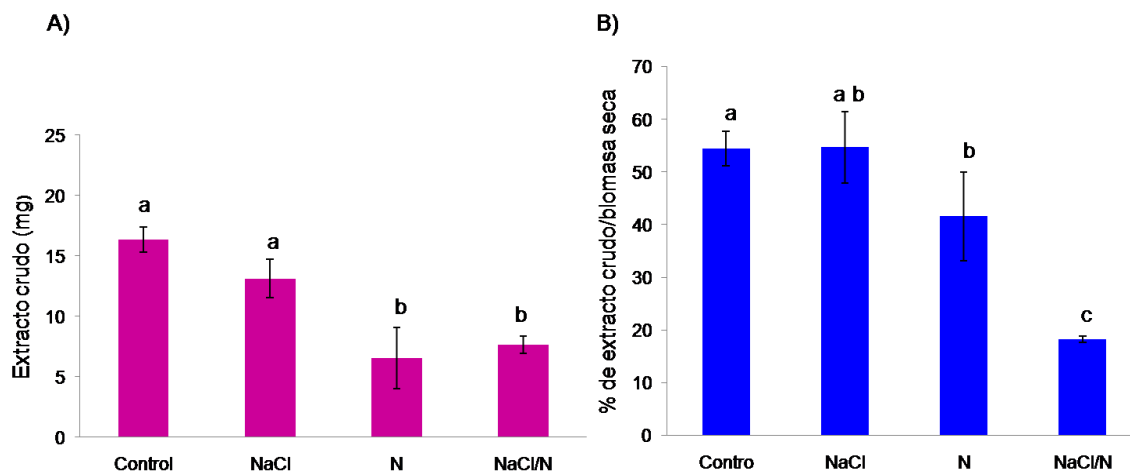
Componente	Para 100 mL H₂O destilada.
I	1 g
KI	2 g

Apéndice C. Gráficas de *Chlamydomonas reinhardtii* correspondientes a la repetición de los experimentos.

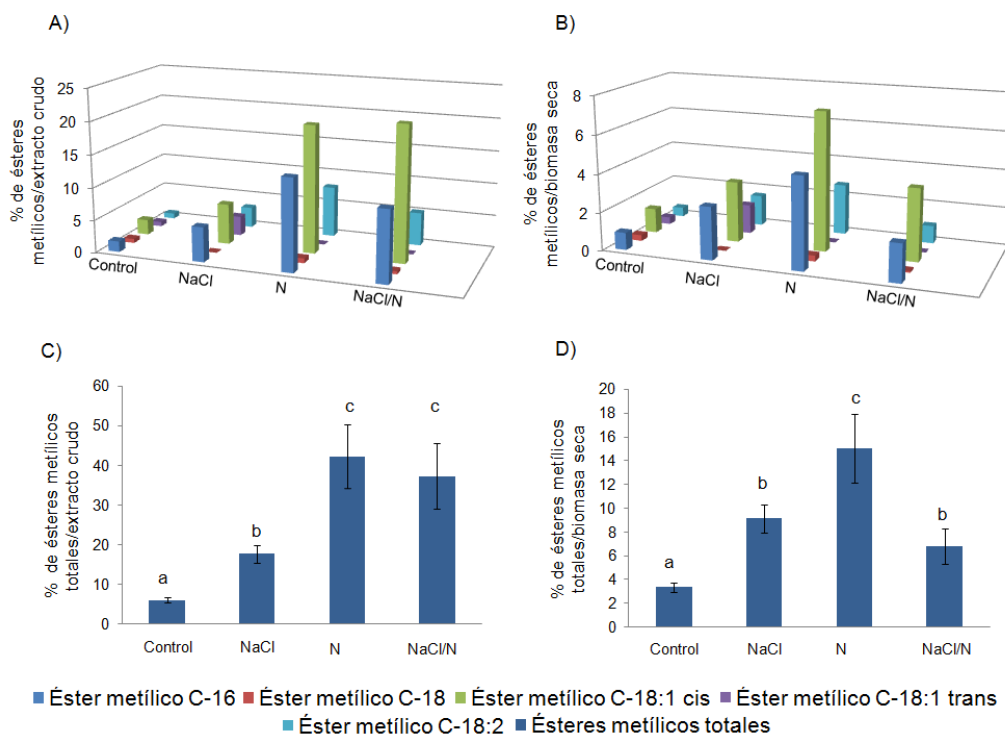
C.1 Experimento de estrés con disminución de la fuente de nitrógeno.



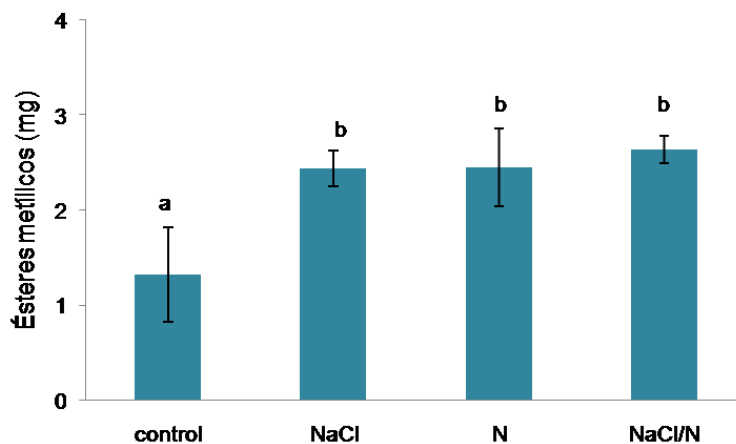
Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).



Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

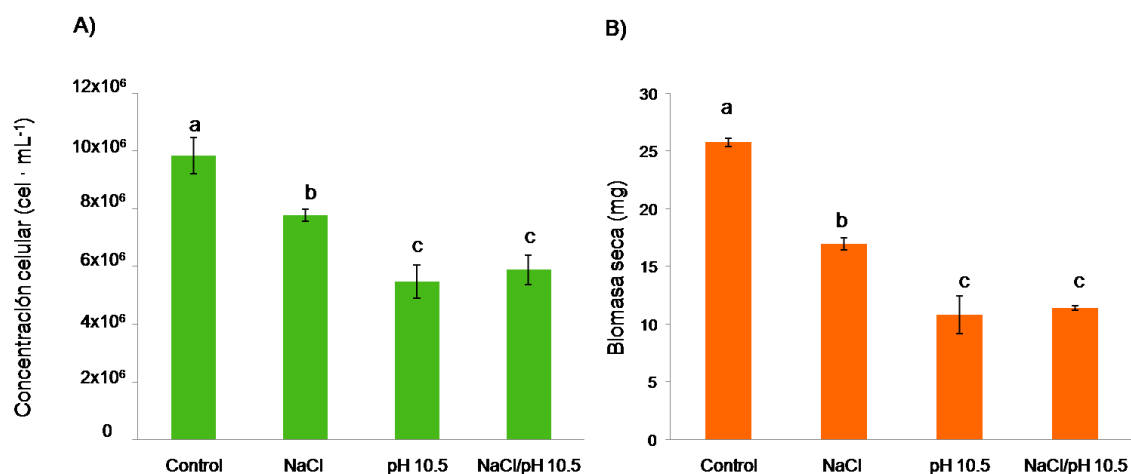


Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

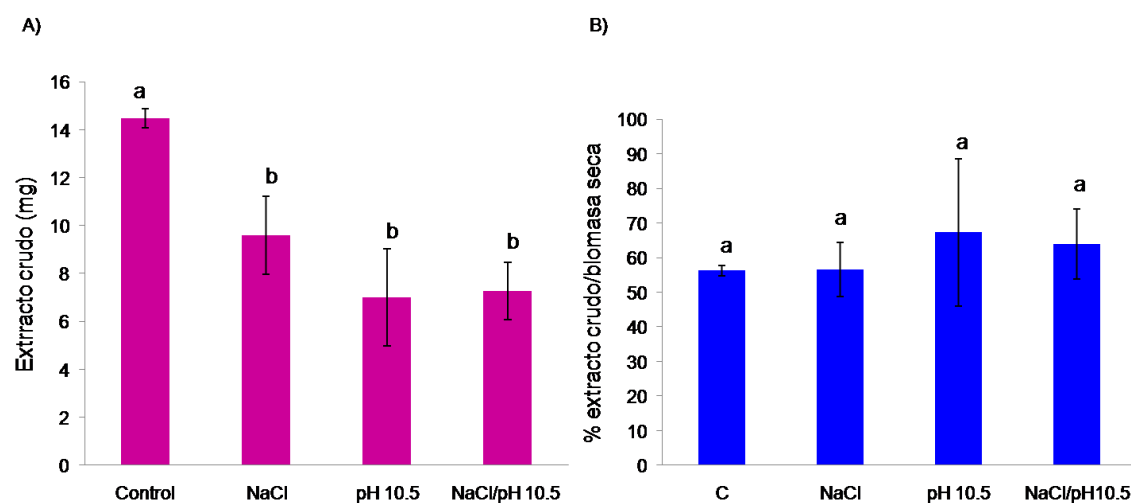


Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3).

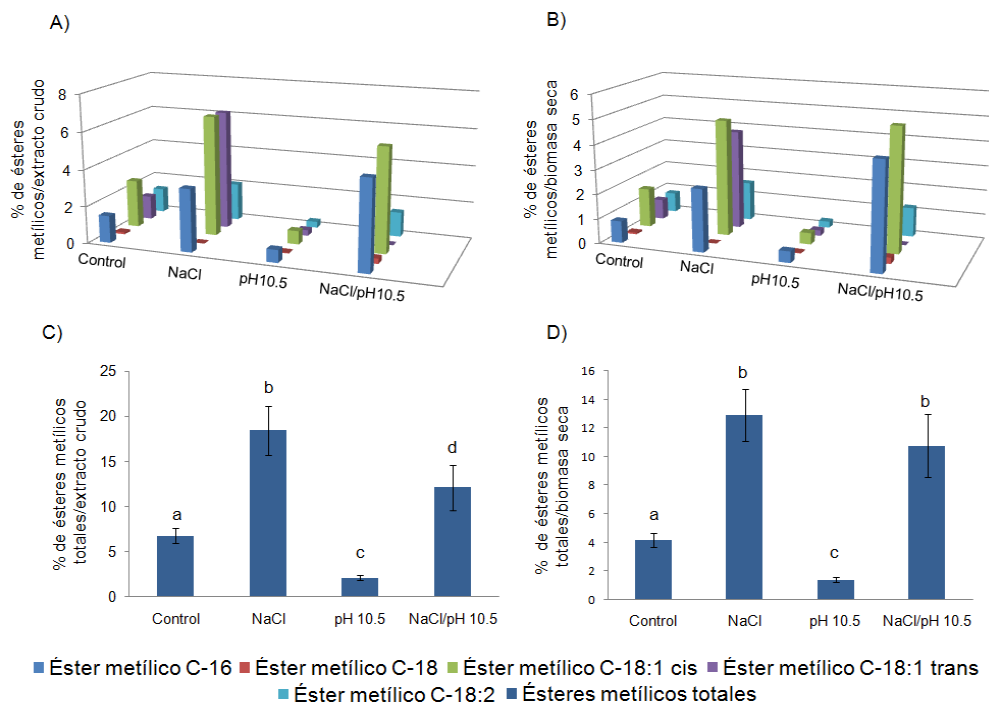
C.2 Experimento de estrés con pH alcalino 10.5



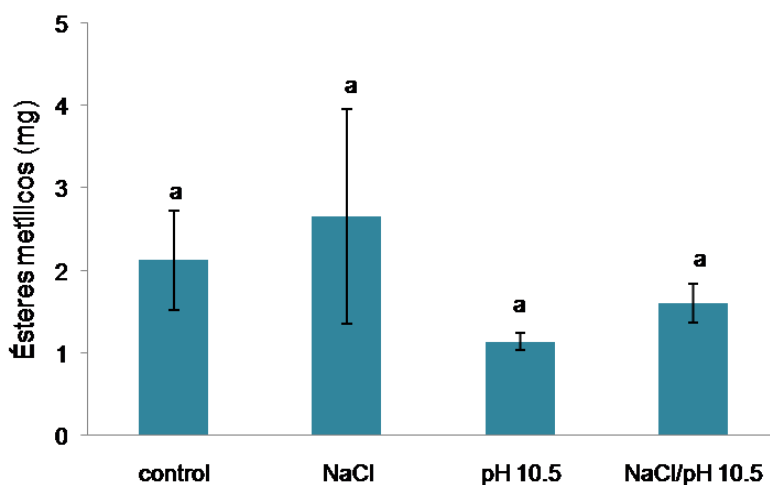
Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).



Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).



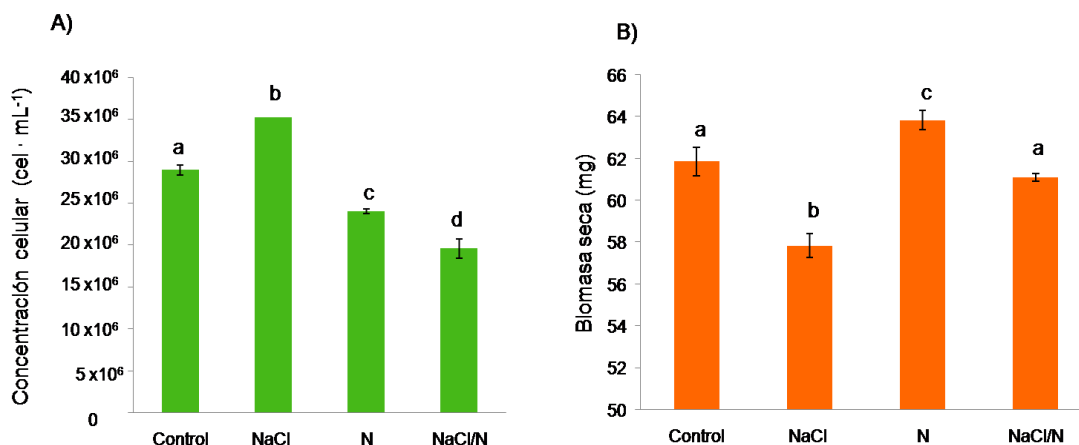
Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).



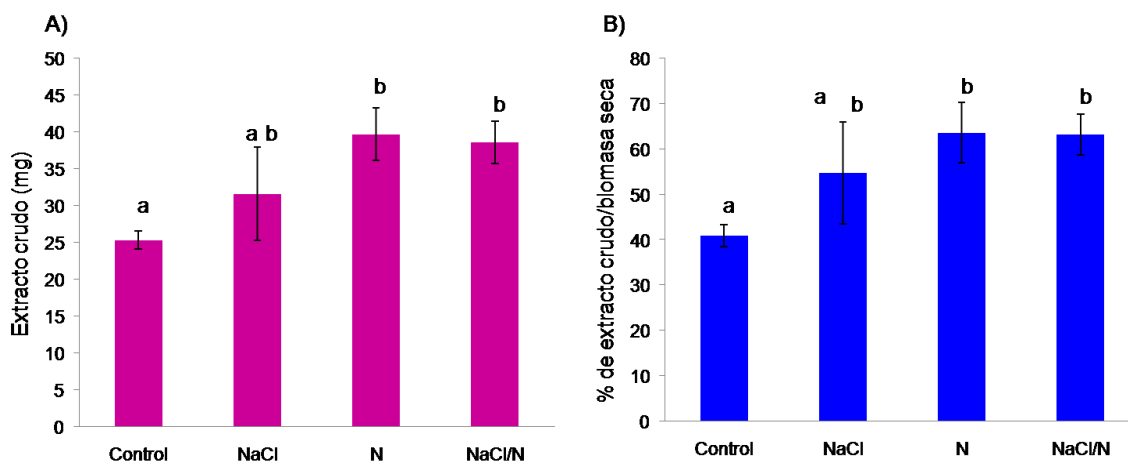
Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino (10.5). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3).

Apéndice D. Gráficas de *Chlorella saccharophila* correspondientes a la repetición de los experimentos.

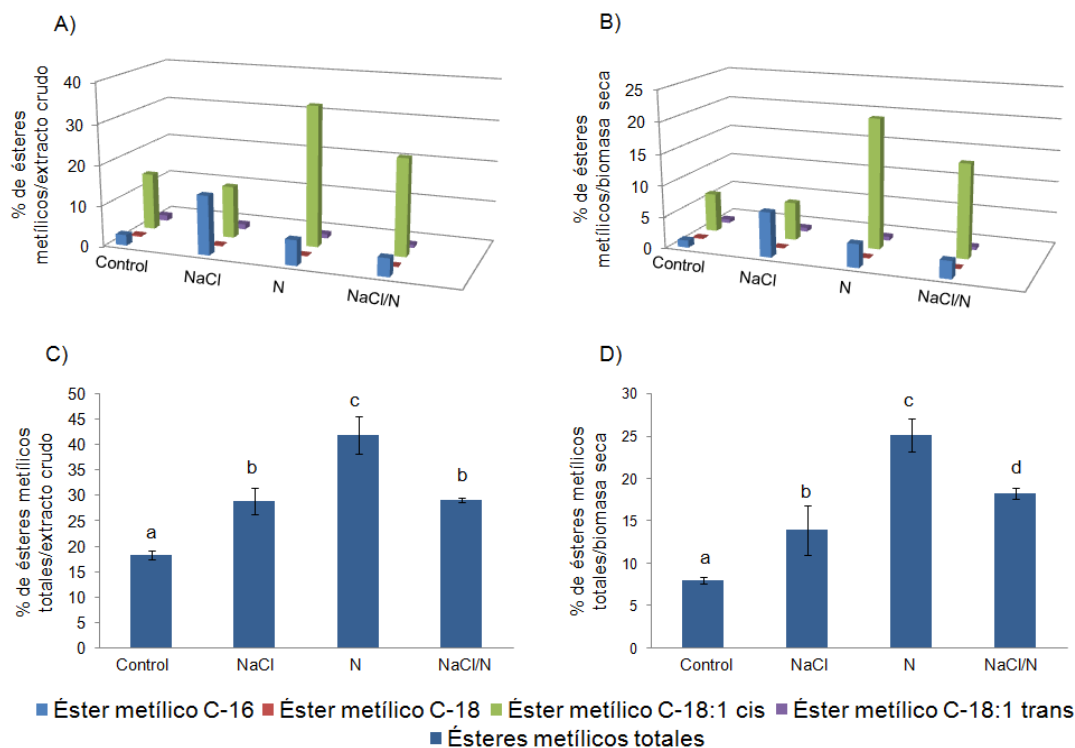
D.1 Experimento de estrés con disminución de la fuente de nitrógeno.



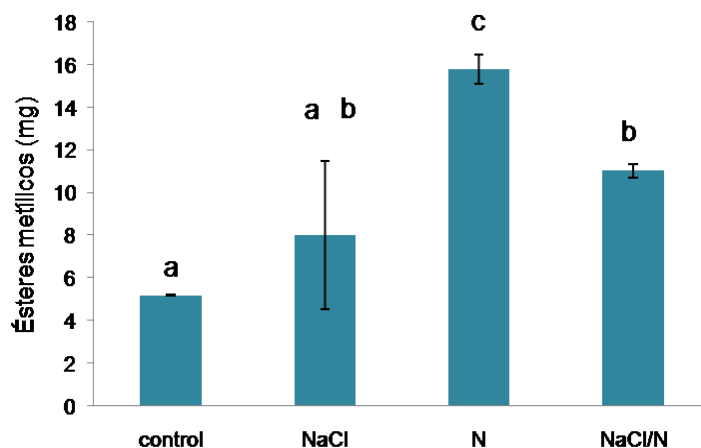
Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).



Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

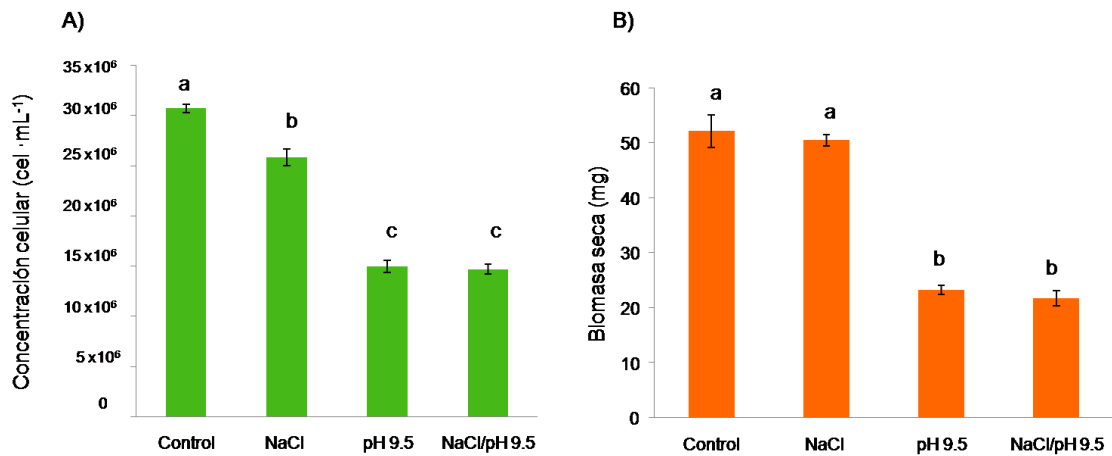


Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

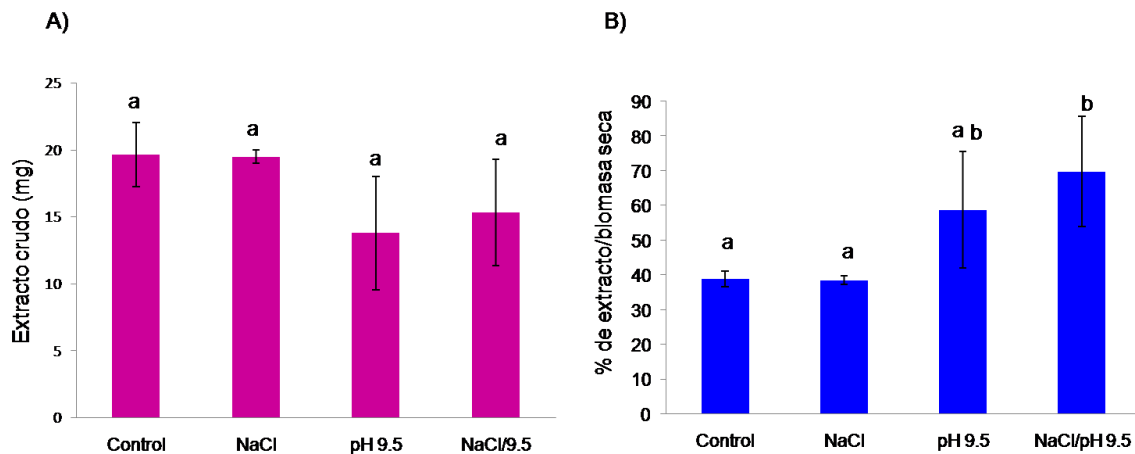


Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; N = estrés por disminución de la fuente de nitrógeno; NaCl/N = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por disminución de la fuente de nitrógeno. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3).

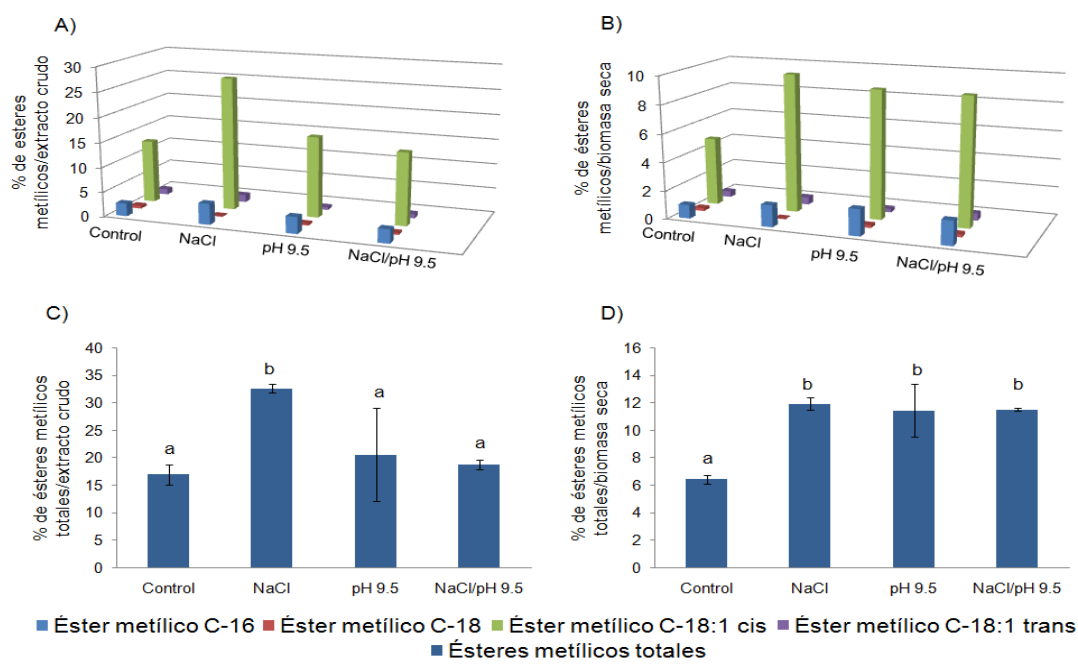
D.2 Experimento de estrés con pH alcalino 9.5



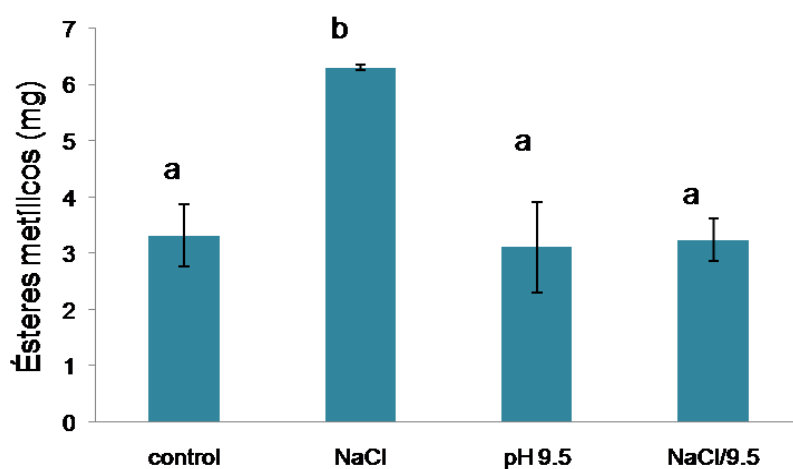
Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza n = 3).



Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

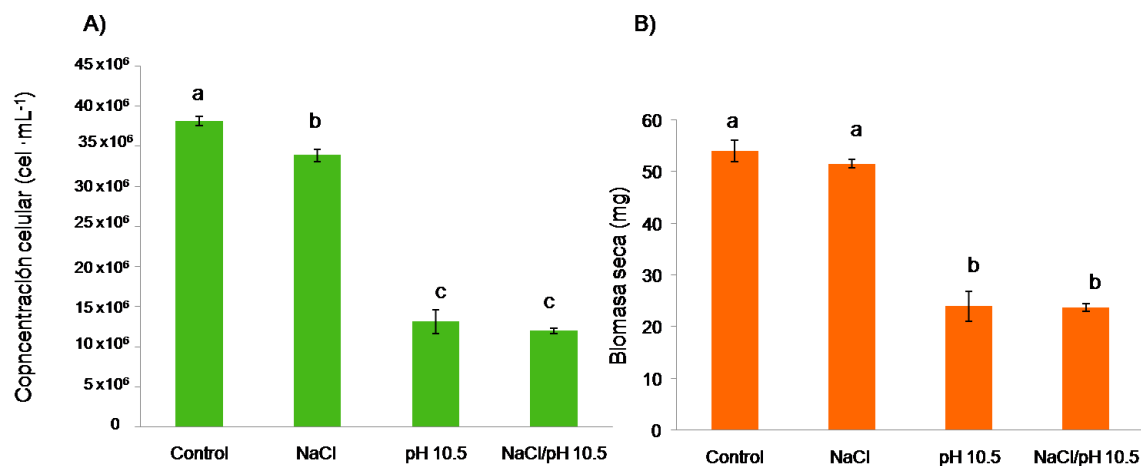


Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

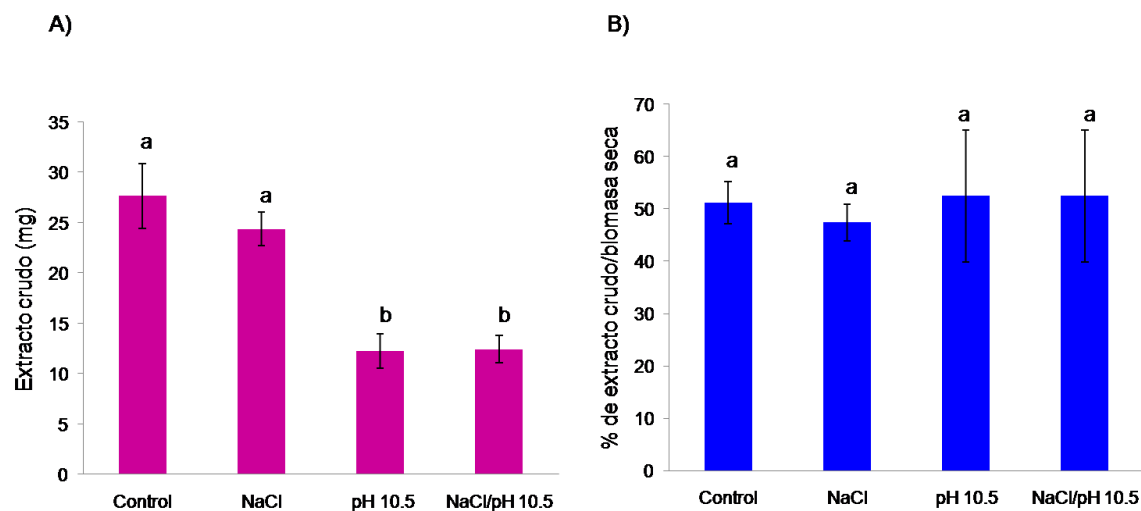


Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 9.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 9.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino (10.5). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3).

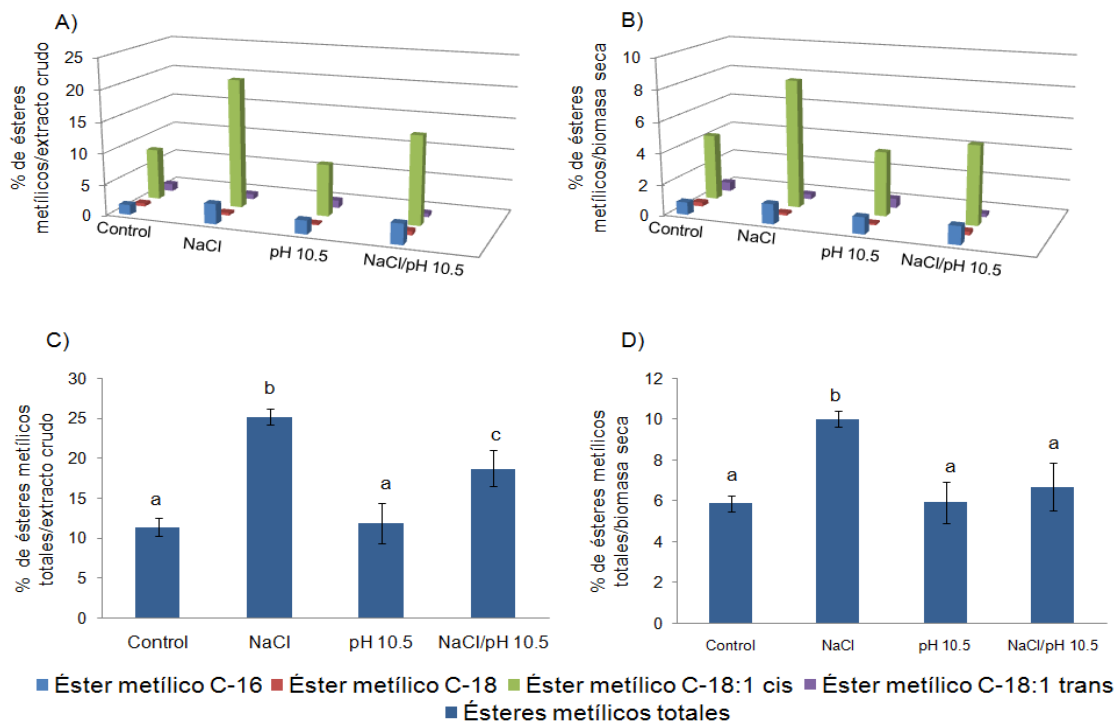
D.2 Experimento de estrés con pH alcalino 10.5



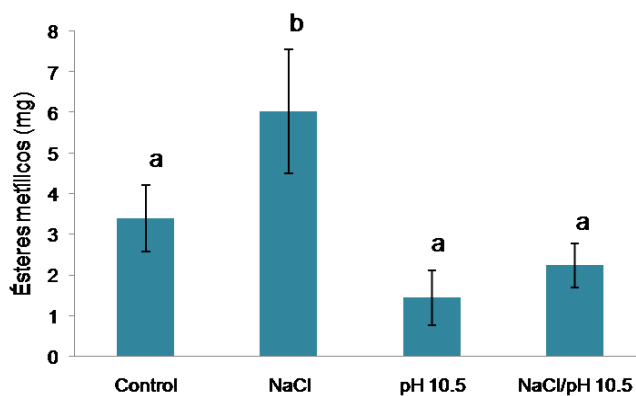
Acumulación de biomasa con los diferentes tratamientos de estrés. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).



Resultado de la extracción de la biomasa con cloroformo/metanol. A) Extracto crudo. B) Porcentaje de extracto crudo con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).



Análisis de ésteres metílicos. A) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto al extracto crudo. B) Porcentaje de ésteres metílicos con respecto a la biomasa seca. C) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto al extracto crudo. D) Porcentaje de ésteres metílicos totales con respecto a la biomasa seca. Tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino. Diferentes letras minúsculas en una misma gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).



Cantidad de ésteres metílicos obtenida a partir de cultivos sometidos a diferentes tratamientos: NaCl = estrés osmótico con NaCl; pH 10.5 = estrés por pH alcalino; NaCl/pH 10.5 = combinación de estrés osmótico con NaCl y estrés por pH alcalino (10.5). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher 95% de confianza, n = 3).