



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Energía Renovable

**Efecto de la limitación de Nitrógeno y Fósforo en la
producción de lípidos en cultivos de las microalgas
verdes *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp.**

Tesis que presenta

ROBERTO ANDRÉS US VÁZQUEZ

En opción al título de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México

Octubre de 2011

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, 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 de maestría, en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología y la Unidad de Energía Renovable, 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, México

Octubre de 2011.

Roberto Andrés Us Vázquez



El trabajo de tesis titulado “Efecto de la limitación de Nitrógeno y Fósforo en la producción de lípidos en cultivos de las microalgas verdes *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp.”, fue desarrollado por el estudiante Roberto Andrés Us Vázquez en el laboratorio BT04 de la Unidad de Biotecnología y en el laboratorio USF15 de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Felipe Barahona Pérez y la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, en el programa de Maestría en Ciencias en Energía Renovable de este Centro.

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela
Director Académico
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Agradecimientos

Agradezco de manera muy especial y sincera a mi asesor, el Dr. Luis Felipe Barahona Pérez, por haber confiado en mí, y darme todo su apoyo y ayuda a lo largo del desarrollo de la tesis. Su experiencia y conocimiento brindado han sido un aporte invaluable. Gracias de todo corazón, por haberme apoyado en todo momento.

A mi asesora la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, por sus aportes relevantes, críticas, comentarios y sugerencias realizadas durante el desarrollo de esta investigación y gracias también, por los consejos para afrontar los momentos difíciles.

Al Comité Tutorial, Dra. Sara Luz Nahuat Dzib, Dra. Rocío Borges Argáez, y a los revisores Dra. Liliana Alzate Gaviria y Dr. Luis Alfonso Rodríguez Gil, por sus valiosos comentarios, su atención, tiempo y disposición que me brindaron.

A la QFB Silvia López Adrián, por la amable donación de la microalga *Scenedesmus* sp. y su asesoría en el cultivo de la misma.

A la Unidad de Energía Renovable y a la Unidad de Biotecnología, así como al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. por las instalaciones y apoyo prestados para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 337342) otorgada para los estudios de maestría.

A la QBA Ileana C. Borges Argáez, QI Tanit Toledano Thompson y M en C Jorge Domínguez Maldonado, por el apoyo técnico brindado en esta investigación. Gracias por su amabilidad, disposición y tiempo brindado.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de la Unidad de Biotecnología (BTD04), Anayeli Beltrán Aguilar, Ángeles Mayorga López, Ernesto Osuna Rosales, Laura Macario González, María Eugenia Duarte Coello, Melissa Casais Molina, Miguel Ángel Vallejo Reyna, Patricia Contreras Pool y Rodrigo Rivera Solís. Gracias por todas las críticas constructivas realizadas durante los seminarios, por todos los momentos alegres que compartimos y por el apoyo brindado en el laboratorio. Me llena de alegría haberlos conocido y haber compartido con ustedes esta etapa de mi carrera profesional.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de la Unidad de Energía Renovable USF15, Alberto Zumárraga Pech, Diana Sánchez Herrera, Limberg Gómez Roque, Nancy Eb Rejón, Pablo Villegas Silva y Santiago Franco Brito. Gracias por compartir muchos momentos inolvidables que guardaré por siempre en mi corazón. Ustedes han enriquecido mi vida con su amistad, cariño y alegría.

De manera muy especial, a mis padres, por su incansable ayuda y apoyo brindado para mi formación profesional, por enseñarme a creer y luchar por mis sueños, y por su infinito amor y cariño. A mis hermanos, por ser parte importante de mi vida y apoyarme en aquellos momentos más necesitados.

Sinceramente, a todos muchas gracias.

DEDICATORIA

*Esta tesis la dedico con mucho amor y cariño
a mis padres, Alba Ruth y José Luis,
a mis hermanos, David, Cecilia y Eugenia,
quienes han sido la base de mi motivación
para desarrollarme profesionalmente.
Por ustedes he logrado
una meta más en mi vida.*

Contenido

| | |
|---|----|
| Introducción..... | 1 |
| Capítulo 1. Antecedentes..... | 3 |
| 1.1 Introducción a las microalgas..... | 3 |
| 1.1.1. Generalidades | 3 |
| 1.1.2. Clasificación..... | 4 |
| 1.1.3. Tipos de organización celular..... | 6 |
| 1.1.4. Aplicaciones y productos de microalgas..... | 6 |
| 1.2 Biocombustibles a partir de las microalgas..... | 9 |
| 1.3. Sistemas de cultivo..... | 14 |
| 1.4 Lípidos de microalgas..... | 18 |
| 1.5 Efecto de la limitación de nutrientes (N y P) sobre la composición lipídica de microalgas.. | 21 |
| 1.6 <i>Scenedesmus obliquus</i> | 24 |
| 1.8 Justificación..... | 26 |
| 1.9 Hipótesis..... | 27 |
| 1.10 Objetivos..... | 27 |
| 1.10.1 Objetivo general..... | 27 |
| 1.10.2 Objetivos específicos..... | 27 |
| Capítulo 2. Materiales y Métodos..... | 28 |
| 2.1 Estrategia experimental..... | 28 |
| 2.2 Cepas de microalgas | 29 |
| 2.3 Medios de cultivos..... | 29 |
| 2.4 Cultivo de las microalgas..... | 30 |
| 2.5 Métodos de aislamiento..... | 30 |
| 2.6 Conteo celular..... | 32 |
| 2.7 Determinación del medio más apropiado para la acumulación de biomasa..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 2.8 Curvas de crecimiento..... | 33 |
| 2.9 Recolección y productividad de biomasa..... | 34 |
| 2.10 Experimentos de limitación de nitrógeno y fósforo..... | 34 |
| 2.11 Extracción de lípidos..... | 35 |
| 2.12 Cromatografía de gases-masas..... | 35 |
| Capítulo 3. Efecto de la limitación de N y P en la producción de lípidos en <i>Scenedesmus obliquus</i> | 37 |
| 3.1 Introducción | 37 |
| 3.2 Materiales y Métodos..... | 39 |
| 3.2.1 Medio de cultivo..... | 39 |
| 3.2.2 <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1)..... | 40 |
| 3.2.3 Experimentos de limitación de N y P..... | 40 |
| 3.3 Resultados y Discusión..... | 41 |
| 3.3.1 Descontaminación de la cepa..... | 41 |
| 3.3.2 Evaluación de los diferentes medios con ácido acético como fuente de carbono orgánico | 42 |
| 3.3.3 Evaluación de los diferentes medios sin fuente de carbono orgánico..... | 43 |
| 3.3.4 Determinación del tiempo para la aplicación del estrés..... | 44 |
| 3.3.5 Efecto de la limitación de N y P..... | 46 |
| 3.3.5.1 Concentración celular..... | 46 |
| 3.3.5.2 Productividad de biomasa..... | 47 |
| 3.3.5.3 Contenido y productividad de lípidos..... | 49 |
| 3.3.5.4 Acumulación de lípidos en la célula..... | 52 |
| 3.3.6 Cambios de morfología y organización celular en <i>Scenedesmus obliquus</i> | 53 |
| 3.3.7 Identificación de los ácidos grasos..... | 54 |
| Conclusiones..... | 56 |

| | |
|--|----|
| Capítulo 4. Efecto de la limitación de N y P en la producción de lípidos en <i>Scenedesmus</i> sp... | 57 |
| 4.1 Introducción..... | 57 |
| 4.2 Materiales y Métodos..... | 59 |
| 4.2.1 Medios de cultivo..... | 59 |
| 4.2.2 <i>Scenedesmus</i> sp. | 59 |
| 4.2.3. Experimentos de limitación de N y P..... | 59 |
| 4.3 Resultados y Discusión..... | 61 |
| 4.3.1 Descontaminación de la cepa..... | 61 |
| 4.3.2 Evaluación de los diferentes medios con ácido acético como fuente de carbono orgánico | 62 |
| 4.3.3 Evaluación de los diferentes medios sin fuente de carbono orgánico..... | 63 |
| 4.3.4 Determinación del tiempo para la aplicación del estrés..... | 64 |
| 4.3.5 Efecto de la limitación de N y P..... | 65 |
| 4.3.5.1 Concentración celular..... | 65 |
| 4.3.5.2 Productividad de biomasa..... | 66 |
| 4.3.5.3 Contenido y productividad de lípidos..... | 68 |
| 4.3.5.4 Acumulación de lípidos en la célula..... | 71 |
| 4.3.6 Identificación de los ácidos grasos..... | 72 |
| Conclusiones | 73 |
| Conclusiones Generales y Perspectivas..... | 74 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1.1. Resumen comparativo de algunas características de las algas..... | 5 |
| Tabla 1.2. Especies de microalgas estudiadas para la biomitigación..... | 8 |
| Tabla 1.3. Contenido de carbohidratos de varias especies de microalgas..... | 11 |
| Tabla 1.4. Comparación del rendimiento de diferentes materias primas para la elaboración del biodiesel | 14 |
| Tabla 1.5. Contenido de lípidos y productividad de diferentes especies de microalgas..... | 19 |
| Tabla 1.6. Clasificación taxonómica de <i>Scenedesmus obliquus</i> | 25 |
| Tabla 1.7. Composición de ácidos grasos de los lípidos de la microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> | 25 |
| Tabla 3.1 Acumulación de lípidos por célula en <i>Scenedesmus obliquus</i> | 53 |
| Tabla 4.1 Resultados obtenidos del aislamiento por dilución..... | 61 |
| Tabla 4.2 Acumulación de lípidos por célula en <i>Scenedesmus</i> sp..... | 72 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 Biocombustibles a partir de microalgas..... | 10 |
| Figura 1.2. Cultivo de <i>Nannochloropsis</i> sp. en estanques abiertos. | 16 |
| Figura 1.3. Producción de biomasa de microalgas basado en fotobiorreactores tubulares..... | 18 |
| Figura 1.4 Colonias de <i>Scenedesmus obliquus</i> | 24 |
| Figura 2.1. Esquema de la estrategia experimental..... | 28 |
| Figura 2.2. Aislamiento por estría cruzada..... | 31 |
| Figura 2.3. Esquema del método de aislamiento por dilución..... | 32 |
| Figura 2.4. Esquema de los cuadrantes evaluados en la cámara de Neubauer..... | 33 |
| Figura 2.5. Estrategia para los experimentos de limitación de nitrógeno o fósforo en el medio de cultivo..... | 35 |
| Figura 3.1 Microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> en medio BB en estado líquido y semisólido... | 41 |
| Figura 3.2 Cultivo axénico de <i>Scenedesmus obliquus</i> | 42 |
| Figura 3.3 Evaluación del efecto de los diferentes medios de cultivo con ácido acético como fuente de carbono en el cultivo de <i>Scenedesmus obliquus</i> | 43 |
| Figura 3.4 Evaluación del efecto de los diferentes medios de cultivo sin fuente de carbono orgánico en <i>Scenedesmus obliquus</i> | 44 |
| Figura 3.5 Curva de crecimiento de <i>Scenedesmus obliquus</i> en medio TAP..... | 45 |
| Figura 3.6 Concentración celular en cultivos de <i>Scenedesmus obliquus</i> después de la limitación de N y P..... | 47 |
| Figura 3.7 Biomasa seca en <i>Scenedesmus obliquus</i> después de la limitación de N y P..... | 48 |
| Figura 3.8 Productividad de biomasa seca en <i>Scenedesmus obliquus</i> después de la limitación de N y P..... | 49 |
| Figura 3.9 Extracto lipídico crudo en <i>Scenedesmus obliquus</i> después de la limitación de N y P..... | 50 |
| Figura 3.10 Contenido lipídico en <i>Scenedesmus obliquus</i> después de la limitación de N y P..... | 51 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.11 Productividad de lípidos en <i>Scenedesmus obliquus</i> después de la limitación de N y P..... | 52 |
| Figura 3.12 Cambios de morfología y organización celular en <i>Scenedesmus obliquus</i> | 54 |
| Figura 4.1. Cultivo axénico de <i>Scenedesmus</i> sp..... | 61 |
| Figura 4.2 Evaluación del efecto de los diferentes medios de cultivo con ácido acético como fuente de carbono en <i>Scenedesmus</i> sp..... | 62 |
| Figura 4.3 Células de <i>Scenedesmus</i> sp..... | 63 |
| Figura 4.4 Evaluación del efecto de los diferentes medios de cultivo sin fuente de carbono orgánico en <i>Scenedesmus</i> sp..... | 64 |
| Figura 4.5 Curva de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> sp. en medio TAP..... | 65 |
| Figura 4.6 Concentración celular en <i>Scenedesmus</i> sp. después de la limitación de N y P | 66 |
| Figura 4.7 Biomasa seca en <i>Scenedesmus</i> sp. después de la limitación de N y P | 67 |
| Figura 4.8 Productividad de biomasa seca en <i>Scenedesmus</i> sp. después de la limitación de N y P..... | 68 |
| Figura 4.9 Extracto lipídico en <i>Scenedesmus</i> sp. después de la limitación de N y P..... | 69 |
| Figura 4.10 Contenido lipídico en <i>Scenedesmus</i> sp. después de la limitación de N y P..... | 70 |
| Figura 4.11 Productividad de lípidos en <i>Scenedesmus</i> sp. después de la limitación de N y P. | 71 |

RESUMEN

Las microalgas han sido recientemente objeto de estudio para su utilización como materia prima en la producción de biocombustibles debido a su alta productividad de lípidos. La biosíntesis de estos compuestos, especialmente los triacilglicéridos, puede ser regulada mediante el control de las condiciones de cultivo, como la limitación de nutrientes, por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto de la limitación de nitrógeno (N) y fósforo (P) en la producción de lípidos en cultivos de las microalgas verdes *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp. Ambas microalgas fueron cultivadas en dos etapas, inicialmente en un medio de cultivo provisto de todos los nutrientes para la acumulación de biomasa y posteriormente con limitación de N y P para incrementar la síntesis de lípidos. La biomasa acumulada fue recuperada por centrifugación y los lípidos se extrajeron con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1 v/v). En los cultivos con *S. obliquus* no se observó diferencia significativa en la productividad de biomasa entre los tratamientos evaluados (limitación de N y P) y el control a los 12 días de cultivo, los valores se obtuvieron en un intervalo de 225.09 a 231.70 mg·L⁻¹·d⁻¹. Por otro lado, la mayor productividad de lípidos, 101.07 mg·L⁻¹·d⁻¹, se obtuvo bajo limitación de N. En el caso de *Scenedesmus* sp., tampoco se observó diferencia significativa en la productividad de biomasa entre los tratamientos y el control a los 10 días de cultivo, los valores se obtuvieron en un intervalo de 311.60 a 334.26 mg·L⁻¹·d⁻¹. La productividad de lípidos aumentó significativamente después del estrés aplicado, obteniéndose 133.55 mg·L⁻¹·d⁻¹ bajo limitación de N. Los valores de productividad lipídica encontrados en ambas especies de *Scenedesmus* fueron superiores al promedio reportado en la literatura (40 mg·L⁻¹·d⁻¹), por lo que ambas especies de microalgas podrían considerarse como candidatas para la obtención de lípidos como materia prima para la producción de biocombustibles.

ABSTRACT

Microalgae have recently been studied for their utilization as raw material for biofuels production due to their high lipid productivity. Lipid biosynthesis, especially triacylglycerides, can be enhanced by certain culture conditions as nutrient starvation. In this study, the effect of nitrogen (N) and phosphorus (P) limitation on lipid production was evaluated in cultures of the green microalgae *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus* sp. Both microalgae were cultivated in two steps, first in a medium containing all the nutrients for biomass accumulation and then in media with N and P limitation to enhance lipid biosynthesis. Biomass was recovered by centrifugation and lipid extraction was carried out with a mixture of chloroform:methanol (2:1 v/v). In *S. obliquus* cultures, no significant differences were observed on biomass productivity between the treatments (N y P limitation) and the control at 12 days of culture with values between 225.09 and 231.70 mg·L⁻¹·d⁻¹. The higher lipid productivity, 101.07 mg·L⁻¹·d⁻¹, was obtained under N limitation. In cultures of *Scenedesmus* sp. no significant differences were observed on biomass productivity between the treatments and the control at 10 days of culture with values between 311.60 and 334.26 mg·L⁻¹·d⁻¹. Lipid productivity significantly increased to 133.55 mg·L⁻¹·d⁻¹ under N limitation. The lipid productivity values observed in cultures of both microalgae are higher than the average reported on the literature (40 mg·L⁻¹·d⁻¹), consequently, these microalgae can be considered as a promissory source of oil for the production of biofuels as biodiesel or biojetfuel.

Introducción

El biodiesel es un biocombustible que ha llamado la atención en años recientes, debido a que es biodegradable, menos contaminante que el diesel y se obtiene de fuentes renovables. En la actualidad, la producción de biodiesel se realiza principalmente a partir de aceites vegetales, tales como canola, soya, girasol y palma aceitera, y en menor medida de grasa animal y aceite vegetal usado [1]. Sin embargo, estas materias primas presentan desventajas con respecto al uso de tierras de cultivo y competencia con la producción de alimentos [2]. Debido a lo anterior, se están investigando otras fuentes de lípidos para la producción de biodiesel, tales como la planta *Jatropha curcas* que puede crecer en zonas semiáridas y áridas [3], y las microalgas que pueden producir cantidades significativas de lípidos con composiciones similares a los de los aceites vegetales. El cultivo de microalgas ha surgido como una alternativa atractiva para la producción de biocombustibles debido a que presentan múltiples ventajas comparadas con las plantas, incluyendo alta eficiencia fotosintética, alta tasa de crecimiento y mayor rendimiento de aceite. Además, pueden ser cultivadas en tierras marginales, requieren menos agua y menor superficie de tierra para su cultivo [4].

La producción de biocombustibles a partir de microalgas es técnicamente viable, pero aún no es económicamente factible [5]. El principal cuello de botella citado en la literatura es la producción de una gran cantidad de lípidos aunado a una gran acumulación de biomasa, seguido por la recolección de la biomasa [6]. Para mejorar la factibilidad económica, un parámetro clave que necesita ser mejorado es la productividad lipídica [7]. Estudios previos han demostrado que el contenido lipídico de algunas microalgas puede incrementarse alterando las condiciones de cultivo, tales como limitación de la fuente de nitrógeno [8, 9] y fósforo [10], disminución de la temperatura [11] y aumento de la concentración de sal [12].

Después del carbono, el nitrógeno y el fósforo son las fuentes más importantes para la nutrición de las microalgas, ya que están directamente asociados con el metabolismo primario; además, se ha reportado que la limitación de estos nutrientes induce la acumulación de lípidos. En este sentido, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la limitación de nitrógeno y fósforo en la producción de lípidos en cultivos de las microalgas

verdes *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp. Estas cepas de microalgas no se han evaluado como materia prima para la producción de biocombustibles.

El presente trabajo está dividido en cuatro capítulos. En el primero se describe un panorama general de las microalgas para la producción de biocombustibles. En el segundo capítulo se describe la metodología utilizada en la realización de los experimentos. En los capítulos tres y cuatro se presentan los resultados obtenidos con *S. obliquus* y *Scenedesmus* sp., respectivamente.

Capítulo 1.

Antecedentes

1.1. Introducción a las microalgas

1.1.1. Generalidades

Las microalgas son microorganismos autótrofos que utilizan la energía de la luz solar y CO₂ de la atmósfera, para sintetizar compuestos orgánicos. Algunas pueden tener un metabolismo heterótrofo, tomando moléculas orgánicas complejas como fuente de energía, pero sin perder afinidades genéticas con sus parientes fotosintéticos [13]. El número de especies de microalgas se ha estimado en más de 50000 especies, pero solo un número limitado, de alrededor de 30000, han sido estudiadas y analizadas [1]. Se caracterizan por la gran diversidad de formas, tamaño, estructura celular, metabolismo, composición química, ciclos de vida y hábitats, por lo que pueden encontrarse en lugares soleados en hábitats terrestres y también en el agua dulce y salada, desde las regiones árticas hasta los trópicos [14].

En la mayoría de los hábitats las microalgas funcionan como los productores primarios en la cadena alimenticia, produciendo material orgánico a partir de compuestos inorgánicos que toman del medio, gracias a la energía del sol y a través del proceso fotosintético. Como resultado de la fotosíntesis, las microalgas almacenan varios productos de reserva, como manitol, almidón y lípidos. Además de ser la fuente básica de alimentos para las cadenas alimenticias, también participan en los diferentes ciclos biogeoquímicos globales, con la producción de oxígeno atmosférico (aportan aproximadamente de 40 a 50% del oxígeno en la atmósfera) y la regulación del clima [15].

1.1.2. Clasificación

Tradicionalmente las microalgas han sido clasificadas de acuerdo a su color, sin embargo, hoy en día el sistema de clasificación más usado se basa en el sistema de cinco reinos de Whittaker [16]. Las algas están clasificadas en siete divisiones repartidas en dos reinos diferentes (Monera y Plantae). Esta clasificación clásica se basa en propiedades de la célula, no del organismo [16]. Algunas de las propiedades más importantes son:

- 1) Composición química y morfológica de la pared celular (si existe).
- 2) Forma de almacenamiento del alimento o de los productos de asimilación de la fotosíntesis.
- 3) Moléculas de clorofila y pigmentos accesorios que contribuyen a la fotosíntesis.
- 4) Número de flagelos y localización de su inserción en las células móviles.
- 5) Morfología de las células.
- 6) Hábitat.
- 7) Estructuras reproductoras.

Basándose en estas propiedades las microalgas son clasificadas en siete divisiones como muestra la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Resumen comparativo de algunas características de las microalgas [16]

| División | Nombre común | Clorofilas | Carotenoides | Producto de almacenamiento | Hábitat |
|--------------|--|---------------------------------|---|---|--------------|
| Chlorophyta | Algas verdes | <i>a y b</i> | β -caroteno, xantofilas | Azúcares, almidón, fructosano, aceites | ad, as, t |
| Charophyta | Algas pétreas | <i>a y b</i> | α , β , caroteno, xantofilas | Almidón | ad |
| Euglenophyta | Euglenoides | <i>a y b</i> | β , caroteno, xantofilas | Paramilón, azúcares | ad, as, t |
| Chrysophyta | Algas amarillo- verdosas y pardas- doradas; diatomeas | <i>a y c</i> | β -caroteno, fucoxantina, xantofilas | Aceites | ad, as, t |
| Phaeophyta | Algas pardas | <i>a y c</i> | β -caroteno, fucoxantina, xantofilas | Manitol, aceites | as |
| Rhodophyta | Algas rojas | <i>a</i> , rara vez <i>d</i> | Xantofilas | Almidón | ad, as |
| Pyrrophyta | Dinoflagelados | <i>a y c</i> | β -caroteno, fucoxantina, dinoxantina | Almidón, glucano | ad, as |

ad: agua dulce; **as:** agua salada; **t:** terrestre

1.1.3. Tipos de organización celular

Las microalgas tienen diferentes tipos de organización celular [17]:

a) Unicelular. Son especies de microalgas que se encuentran solitarias en el medio natural, pueden ser móviles o no móviles. En las formas móviles, la movilidad se debe fundamentalmente a la presencia de flagelos.

b) Colonial. Son especies de microalgas que forman un agregado de células. Algunas microalgas pueden formar colonias con movilidad (p. ej. *Volvox*) o colonias no motiles (p. ej. *Gloeocystis*). Las células no móviles pueden organizarse en formas cenobióticas con un número fijo de células en colonias (p. ej. *Scenedesmus*).

c) Filamentosa. Generalmente presentan células cilíndricas dispuestas de extremo a extremo que pueden presentar formas ramificadas o lineales.

1.1.4. Aplicaciones y productos de microalgas

La producción de microalgas se ha estudiado durante décadas [18], dada la gran variedad de productos metabólicos que pueden obtenerse de ellas como complementos alimenticios, lípidos, polímeros, toxinas, pigmentos y biocombustibles. Algunos ejemplos de ellos son: β -carotenos, astaxantina, luteína [19]. También pueden emplearse en diferentes aplicaciones como en el tratamiento de aguas residuales y en la biomitigación de CO₂ como se describe más adelante.

a) Tratamiento de aguas residuales

Las aguas residuales, ya sean de origen doméstico, animal o industrial, debido a su alto contenido de nutrientes constituyen un medio apropiado para el crecimiento de microalgas, las cuales han demostrado su capacidad de remover cantidades apreciables de estos nutrientes [20].

El proceso integral de tratamiento de aguas residuales usando cultivos de microalgas, presenta ventajas tan importantes como son: el mejoramiento de la calidad del efluente mediante un mecanismo de bajo costo energético con el aprovechamiento de nutrientes que son desechados y que pueden ser incorporados a la biomasa; la cual presenta

un alto valor comercial. Esta biomasa según su composición química, puede convertirse en fuente productora de fertilizantes, alimentos animales (para ganado vacuno, avicultura, porcicultura y acuicultura), energía, además de otras aplicaciones en la industria química, biomédica y farmacológica [21].

Varias aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales han sido reportadas en la literatura. Por ejemplo, Sawayama *et al.* [22] utilizaron la microalga *Botryococcus braunii* para eliminar el nitrato y el fosfato de las aguas residuales después del tratamiento primario, junto con la producción de biomasa rica en hidrocarburos. Martínez *et al.* [23] lograron una importante eliminación de fósforo y nitrógeno de las aguas residuales urbanas mediante la microalga *Scenedesmus obliquus*. Estos autores fueron capaces de alcanzar el 98% de eliminación de fósforo y una eliminación completa (100%) de amonio en un cultivo con agitación a 25 °C con tiempos de retención de 94 y 183 h, respectivamente. Aslan y Kapdan [24] mostraron que *Chlorella vulgaris* es otra microalga que puede ser utilizada para la eliminación de nitrógeno y fósforo de las aguas residuales con una eficiencia de remoción promedio de 72% para el nitrógeno y 28% para el fósforo.

Por lo mencionado anteriormente, las microalgas presentan una buena alternativa para el tratamiento de aguas residuales por su capacidad de remoción de nutrientes.

b) Biomitigación de CO₂

Las microalgas pueden ser utilizadas para fijar CO₂ a partir de tres fuentes diferentes: CO₂ de la atmósfera, CO₂ procedente de las emisiones de plantas de energía y procesos industriales (gases de combustión), y CO₂ de los carbonatos solubles (NaHCO₃ y Na₂CO₃) [25]. En general, las microalgas crecen más rápido que las plantas terrestres y la eficiencia de fijación de CO₂ es aproximadamente 10-50 veces más rápida. De acuerdo a Chisti [5], por 1 kg de biomasa seca de algas se fija aproximadamente 1.83 kg de CO₂, por consiguiente, la producción de biomasa de microalgas puede contribuir a la fijación biológica de CO₂.

En la naturaleza las microalgas capturan el CO₂ de la atmósfera durante la fotosíntesis. Sin embargo, el rendimiento de fijación se ve limitado por la baja concentración de CO₂ en el aire (aproximadamente 0.0387 % v/v) [26]. Por el contrario, la

captura de CO₂ de las emisiones de gases de combustión de las centrales eléctricas que queman combustibles fósiles logra una mejor recuperación debido a la mayor concentración de CO₂ de hasta un 15 % v/v. Sin embargo, sólo un pequeño número de algas son tolerantes a los altos niveles de SO_x y NO_x que están presentes en los gases de combustión. Los gases también tienen que ser enfriados antes de la inyección en el medio de cultivo. La selección de cepas de microalgas adecuadas para la biomitigación de CO₂ tiene un efecto significativo sobre la eficacia y competitividad de los costos de este proceso. Los atributos deseables para la fijación de CO₂ son:

- Un crecimiento elevado y altas tasas de utilización de CO₂.
- Alta tolerancia a trazas de componentes de los gases de combustión, tales como SO_x y NO_x.
- Generación de co-productos, por ejemplo, aceites como materia prima para la producción de biocombustibles y compuestos bioactivos como el antioxidante β-caroteno.
- Tolerancia a temperaturas altas del agua para minimizar el costo de refrigeración de los gases de combustión y ser capaz de utilizar nutrientes provenientes de aguas residuales.

En la Tabla 1.2 se presentan datos sobre las características conocidas de especies estudiadas para la mitigación de CO₂ [25].

Tabla 1.2. Especies de microalgas estudiadas para la biomitigación.

| Microalga | T (°C) | Concentración suministrada de CO ₂ (% v/v) | Tasa de fijación de CO ₂ (g L ⁻¹) |
|--------------------------------|--------|---|--|
| <i>Chlorococcum littorale</i> | 40 | 30 | 1 |
| <i>Chlorella kessleri</i> | 18 | 30 | 0.163 |
| <i>Chlorella sp.</i> | 40 | 42 | 1 |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | 18 | 30 | 0.26 |
| <i>Spirulina sp.</i> | 18 | 30 | 0.413 |
| <i>Haematococcus pluvialis</i> | 16–34 | 20 | 0.143 |
| <i>Dunalliella tertiolecta</i> | 3 | 27 | 0.313 |

Una serie de estudios ha demostrado el potencial de las microalgas para la fijación biológica de carbono en diversas condiciones. Por ejemplo, de Morais y Costa [27] encontraron que las especies de microalgas *S. obliquus* y *Chlorella kessleri* son capaces de crecer en medios que contienen hasta un 18% v/v de CO₂. Chang y Yang [28] encontraron que ciertas especies de *Chlorella* pueden crecer en una atmósfera con CO₂ de hasta un 40% v/v. Al comparar *B. braunii*, *C. vulgaris* y *Scenedesmus sp.* en condiciones de crecimiento con gases de combustión, Yoo *et al.* [29] encontraron que *Scenedesmus sp.* es la más adecuada para la biomitigación de CO₂ debido a su alta tasa de producción de biomasa (0.218 g L⁻¹ d⁻¹) y su alta capacidad de fijación de carbono.

1.2 Biocombustibles a partir de microalgas

Comparadas con las plantas, las microalgas presentan una alta eficiencia fotosintética, pues la eficiencia de la energía resultante de la fotosíntesis lograda en plantas es en general inferior a 1% [30], mientras que las microalgas pueden lograr una mayor eficiencia de energía, hasta un 5% de la energía solar en biomasa. También, requieren menor superficie de tierra para su cultivo, pueden cultivarse en cualquier época del año y requieren menos agua comparadas con los cultivos agrícolas [4]. Por tanto, han sido propuestas como buenas candidatas para la producción de diversos biocombustibles como el metano (por digestión anaerobia de la biomasa), bioetanol (por fermentación del almidón), producción fotobiológica de hidrógeno, así como biodiesel y bioqueroseno a partir del aceite que sintetizan [4], como se presenta a continuación (Figura 1.1).

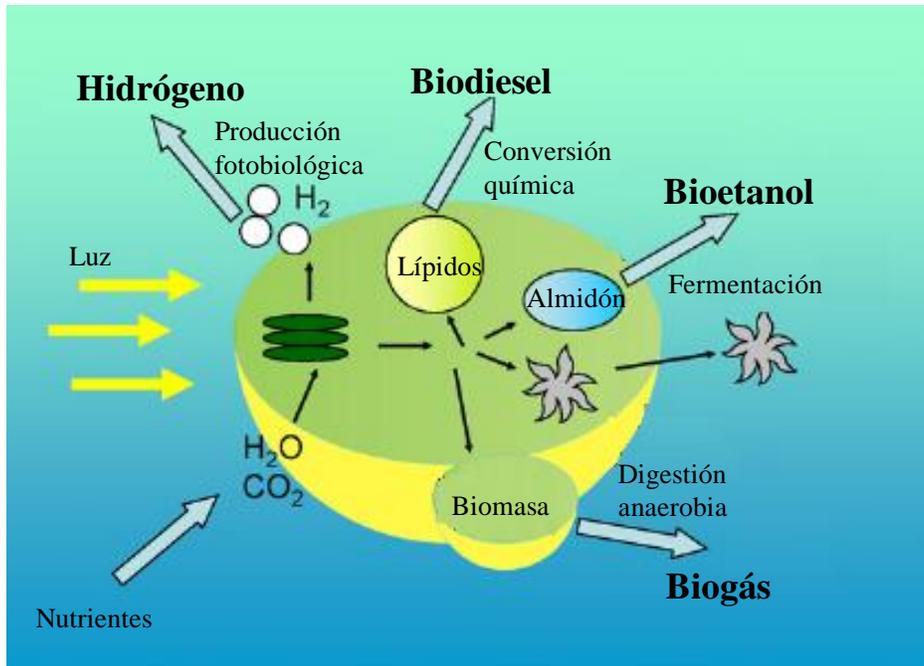


Figura 1.1 Biocombustibles a partir de microalgas [31].

a) Bioetanol

Convencionalmente, el etanol puede ser producido de dos maneras: por un proceso químico, en el cual es sintetizado a partir del etileno proveniente de fuentes fósiles; o bien, por un proceso de fermentación, utilizando fuentes de carbono como materia prima (p. ej. caña de azúcar) [32]. Las microalgas son una fuente potencial de sustrato de fermentación, ya que según las condiciones de cultivo, pueden contener altos niveles de compuestos de carbono, directamente disponibles para la fermentación [33]. Microalgas como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, entre otras, contienen una gran cantidad de carbohidratos que pueden ser aprovechados como materia prima para la producción de etanol (Tabla 1.3) [32].

Tabla 1.3. Contenido de carbohidratos de varias especies de microalgas [20].

| Especie de microalga | % de carbohidratos (peso seco) |
|----------------------------------|--------------------------------|
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 17 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 12-17 |
| <i>Dunaliella salina</i> | 32 |
| <i>Spirulina maxima</i> | 13-16 |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | 10-17 |
| <i>Scenedesmus dimorphus</i> | 21-52 |

El principio de la producción de etanol por microalgas consiste en el cultivo, recolección de las células, preparación de la biomasa, fermentación y destilación del etanol. La preparación de la biomasa se puede realizar a través de equipos mecánicos o enzimas que degradan las paredes celulares. Cuando las células se rompen, se añade levadura a la biomasa (p. ej. *Saccharomyces*) y la fermentación comienza. De esta manera, el azúcar se convierte en etanol por efecto del metabolismo de la levadura y éste se destila para purificarlo [34].

Intentos recientes para la producción de etanol se están llevando a cabo con microalgas como materia prima para el proceso de fermentación [20]. Harun *et al.* [35] han llevado a cabo experimentos para estudiar la microalga *Chlorococcum sp.* como sustrato, utilizando la levadura *Saccharomyces bayanus* para la fermentación. Los resultados de este estudio mostraron una concentración máxima de bioetanol de 3.83 g L⁻¹ obtenidos a partir de 10 g L⁻¹ de la biomasa residual de la extracción de lípidos. De igual manera, Ueno *et al.* [36] produjeron etanol a partir de la microalga marina *Chlorococcum littorale* a través de un proceso de fermentación y alcanzó una productividad de etanol máxima de 450 µmol g⁻¹ en base al peso seco a 38 °C. Estos estudios apoyan la idoneidad de las microalgas como sustrato prometedor para la producción de bioetanol.

En la actualidad se están desarrollando estudios sobre modificación genética de microalgas para la producción directa de bioetanol, aunque todavía se encuentra en sus primeras etapas. Un ejemplo es la empresa Algenol Biofuels Inc., la cual modificó genéticamente una cepa del género *Synechococcus* que convierte el piruvato a etanol dentro de cada célula [37]. El etanol producido se difunde a través de la pared celular hacia el

medio de cultivo y se evapora. El vapor de agua-etanol condensa en la superficie interna de un biorreactor, se recoge por gravedad y se destila para la obtención de etanol anhidro [38]. La microalga fue diseñada en Canadá y el centro de producción está funcionando en Sonora, México [39]. Esta planta piloto es capaz de producir etanol a un ritmo de más de 56, 219 L ha⁻¹ año⁻¹ [40].

c) Biogás

El metano o biogás es el producto de la digestión anaerobia, que consiste en la descomposición de la materia orgánica para producir un gas que contiene aproximadamente 55 - 65% de metano (CH₄), 30 - 45% de dióxido de carbono (CO₂), trazas de sulfuro de hidrógeno (H₂S) y vapor de agua [41]. El proceso de la digestión anaerobia se optimiza cuando se utilizan compuestos con contenido de humedad entre 80% y 90%. Por tanto, el uso de la biomasa de microalgas es apropiado para este proceso [42].

Uno de los primeros estudios sobre la viabilidad de la utilización de microalgas para la producción de metano se publicó hace más de 50 años y se llegó a la conclusión de que el proceso podría ser factible y podría optimizarse aún más en el futuro [43]. Sin embargo, actualmente la investigación en el campo de las microalgas como sustratos para la producción de biogás es muy limitada [44], a pesar de que los últimos cálculos teóricos indican su potencial como materia prima para la producción de este biocombustible [45].

d) Biohidrógeno

El hidrógeno es una molécula de origen natural, que es portador de energía limpia y eficiente. Las microalgas son candidatas para su producción, ya que poseen las características genéticas, metabólicas y enzimáticas necesarias [42]. Bajo condiciones anaeróbicas, las microalgas eucariotas producen hidrógeno como donante de electrones en el proceso de fijación de CO₂. Durante la fotosíntesis, las microalgas convierten moléculas de agua en iones hidrógeno (H⁺) y oxígeno. Los iones hidrógeno son convertidos en H₂ por la enzima hidrogenasa [46]. La producción fotosintética de O₂ resulta en una inhibición rápida de la enzima hidrogenasa y la producción de H₂ se interrumpe. Por lo tanto, el

cultivo de microalgas para la producción de hidrógeno debe tener lugar en condiciones anaerobias [42].

La producción de hidrógeno fue reportada por primera vez por Gaffron y Rubin en 1942 [47] con la microalga verde *Scenedesmus obliquus*. Sin embargo, el metabolismo de la producción de hidrógeno en las microalgas es todavía un tema de investigación básica. El proceso de producción de hidrógeno por algas verdes es de interés debido a que lo generan a partir de dos recursos abundantes: luz y agua. Un requisito previo es la adaptación de las microalgas a una atmósfera anaerobia [48]. Aunque se han logrado grandes avances durante la última década en la producción de biohidrógeno, al momento parece estar lejos de la aplicación industrial debido a su baja productividad [49]

e) Biodiesel

El biodiesel es un biocombustible que ha llamado la atención en años recientes, debido a que es biodegradable, menos contaminante que el diesel y renovable. En la actualidad, la producción de biodiesel se realiza principalmente a partir de aceites vegetales, tales como canola, soya, girasol y palma aceitera, y en menor medida de grasa animal y aceite vegetal usado [50].

En años recientes, las microalgas han emergido como una fuente prometedora de materia prima para la producción de biodiesel, debido a que pueden contener cantidades significativas de lípidos con composiciones similares a los de los aceites vegetales [51]. Las microalgas que se están investigando en la producción de biodiesel son por lo general microalgas verdes, que poseen altas tasas de crecimiento. En condiciones óptimas pueden duplicar su biomasa en menos de 24 h [52]. También, pueden tener un alto contenido de lípidos y con base en la productividad de biomasa en fotobiorreactores, se ha estimado que producirían más aceite comparado con los cultivos agrícolas (Tabla 1.4). Además, en teoría, requerirían de una superficie mucho menor de tierra que otras materias primas de origen agrícola para la producción de biodiesel; de 49 a 132 veces menor en comparación con los cultivos de colza o soja, respectivamente, cuando se comparan con microalgas con 30% (peso/peso) de aceite en la biomasa seca [1].

Actualmente, la producción de biodiesel es percibida como la tecnología más cercana a la viabilidad a escala comercial [26]. Cabe señalar que la acumulación de lípidos y la utilización de los mismos para la producción de biodiesel parece ser una solución a mediano plazo [53], ya que la optimización para la obtención de una mayor cantidad de lípidos se ha estudiado en los últimos años [54].

Tabla 1.4. Comparación del rendimiento de diferentes materias primas para la elaboración del biodiesel [1].

| Fuente | Contenido de aceite (% peso seco) | Rendimiento de aceite ($L^{-1} \cdot ha \cdot año^{-1}$) | Uso de tierra ($m^2 \cdot año^{-1} \cdot kg \text{ biodiesel}^{-1}$) | Producción de biodiesel ($Kg \text{ biodiesel} \cdot ha \cdot año^{-1}$) |
|--|-----------------------------------|--|--|--|
| Maíz (<i>Zea mays</i>) | 44 | 172 | 66 | 152 |
| Soja (<i>Glycine max</i>) | 18 | 636 | 18 | 562 |
| Jatropha (<i>Jatropha curcas</i>) | 28 | 741 | 15 | 656 |
| Canola (<i>Brassica napus</i>) | 41 | 974 | 12 | 862 |
| Girasol (<i>Heliantus annuus</i>) | 40 | 1070 | 11 | 946 |
| Palma (<i>Elaeis guineensis</i>) | 36 | 5366 | 2 | 4747 |
| Microalgas (Bajo contenido de aceite) | 30 | 58,700 | 0.2 | 51, 927 |
| Microalgas (Alto contenido de aceite) | 70 | 136, 900 | 0.1 | 121, 104 |

1.3 Sistemas de cultivo

El cultivo de microalgas se ha llevado a cabo durante siglos. De hecho, algas verde-azules como: *Nostoc*, *Spirulina* y *Chlorella* se han utilizado para la alimentación desde hace miles de años [55]. Por ejemplo, *Spirulina* se ha utilizado como fuente de alimentos en Asia por más de 1000 años y en el lago de Texcoco (México), por la civilización azteca, hace unos 700 años [1].

En 1980, hubo 46 grandes fábricas en Asia que produjeron más de 1000 kg de biomasa seca de microalgas por mes (principalmente *Chlorella*) como fuente de alimento. En 1986, la producción comercial de *Dunaliella salina*, como fuente de β -caroteno, se convirtió en la tercera industria de microalgas más importante, cuando se estableció por industrias biotecnológicas en Australia. Estas industrias fueron acompañadas por otras plantas comerciales en Israel y E.U.A. Recientemente, varias plantas para producción comercial de astaxantina obtenida de *Haematococcus pluvialis* se han establecido en los EE.UU. e India. Así, en un período de unos 30 años, la industria de la biotecnología de microalgas ha crecido y se ha diversificado de manera significativa [56]. Las microalgas pueden cultivarse comercialmente en dos tipos de sistemas, ya sea en estanques abiertos o en fotobiorreactores, los cuales se mencionan a continuación.

a) Sistemas abiertos

Los sistemas de producción de biomasa de microalgas en estanques abiertos se han utilizado desde la década de los 50 para la producción de biomasa como fuente de alimento [5]. Estos sistemas se pueden clasificar en aguas naturales (lagos, lagunas y estanques) y estanques artificiales o contenedores. Los estanques “raceway” son el sistema artificial más utilizado. Éstos se hacen típicamente en un circuito cerrado, los canales de recirculación son de forma ovalada (Figura 1.2). Tienen generalmente entre 0.2 y 0.5 m de profundidad y son necesarias la mezcla y la circulación del cultivo para estabilizar el crecimiento de las microalgas y la productividad. Los estanques “raceway” se construyen generalmente de concreto, pero también pueden construirse estanques sobre tierra compactada revestidos con plástico. En un ciclo de producción continua, el precultivo de microalgas y los nutrientes se introducen en la parte delantera de la rueda. Mediante mezclado se distribuye a través del todo el sistema y se mantiene un determinado tiempo hasta la recuperación de la biomasa. La rueda está en operación continua para evitar la sedimentación. El requisito de CO_2 para el crecimiento de las microalgas es por lo general proporcionado por el aire de la superficie, pero se pueden instalar aireadores sumergidos para aumentar el suministro y absorción de CO_2 [42].



Figura 1.2. Cultivo de *Nannochloropsis* sp. en estanques abiertos. Imagen de Nature Beta Technologies Ltd, Eilat, Israel [57].

En comparación con los fotobiorreactores cerrados, un estanque abierto es el método más barato para la producción de biomasa de microalgas a gran escala. Los estanques abiertos no compiten por la tierra con cultivos agrícolas existentes, ya que pueden ser implementados en zonas de tierras marginales, tienen menor requerimiento de energía y el mantenimiento y limpieza de estos sistemas son más fáciles. Estos sistemas no son convenientes para especies que son susceptibles a la contaminación con otros microorganismos. Sin embargo, algunas especies de microalgas de crecimiento acelerado (por ejemplo *Chlorella*) o aquellas que pueden vivir en ambientes extremos tales como alto pH (por ejemplo *Spirulina*), ó alta salinidad (por ejemplo *Dunalliella*), son apropiadas para el cultivo a gran escala en estanques abiertos [42]. Un ejemplo de monocultivos a gran escala es la producción de *D. salina* para la producción de β -caroteno en las aguas extremadamente halófilas de la laguna Hutt, en Australia [58].

En lo que respecta a la productividad de biomasa, los estanques abiertos son menos eficientes en comparación con los fotobiorreactores. Esto se puede atribuir a varios factores

determinantes, incluyendo las pérdidas por evaporación y cambios de temperatura en el medio de cultivo, mezclado ineficiente y limitación de la luz. Las fluctuaciones de temperatura debido a los ciclos diurnos y las variaciones estacionales son difíciles de controlar en estanques abiertos [4]. Deficiencias debido a la difusión de CO₂ de la atmósfera pueden dar lugar a una baja productividad de biomasa. Además, mecanismos de agitación ineficientes, pueden dar lugar a bajas tasas de transferencia de CO₂ que resulta en baja productividad de biomasa. La limitación de luz debido a la profundidad del estanque, también puede causar reducción de la productividad de biomasa. Sin embargo, una mejora en el suministro de luz es posible mediante la reducción de la altura del estanque [59].

b) Sistemas cerrados

Los sistemas cerrados más conocidos son los fotobiorreactores. Estos sistemas incluyen una gran diversidad de formas y tamaños entre los que destacan los fotobiorreactores de placa plana, tubulares y de columna vertical [59]. Están diseñados para superar algunos de los principales problemas asociados con los sistemas abiertos: ofrecen un mejor control sobre las condiciones de cultivo y parámetros de crecimiento (pH, temperatura y aeración); tienen un mayor rendimiento de biomasa (2 a 5 g·L⁻¹); reducen la pérdida de CO₂; evitan la evaporación, inducen un menor tiempo de cosecha (de 2 a 4 semanas); y ofrecen un entorno más seguro y protegido para prevenir la contaminación o minimizar la invasión de microorganismos competidores [1]. Un ejemplo de fotobiorreactor tubular se muestra en la Figura 1.3. El conjunto de estos fotobiorreactores produce 100 t por año de biomasa, perteneciente a la industria Klötze, en Alemania [60].



Figura 1.3. Producción de biomasa de microalgas basado en fotobiorreactores tubulares. Imagen de la industria Klötze, en Alemania [61].

Pese a sus ventajas, los fotobiorreactores sufren de varias desventajas que deben ser consideradas y resueltas. Sus principales limitaciones son: sobrecalentamiento, la acumulación de oxígeno, dificultad de escalamiento, el alto costo de la construcción, la recolección de la biomasa, el daño celular por el esfuerzo cortante y el deterioro de los materiales utilizados [1].

1.4 Lípidos de microalgas

Los lípidos desempeñan diversas funciones en los organismos vivos y se pueden dividir en dos grupos principales: los lípidos no polares (triacilglicéridos, esteroides libres, ácidos grasos, ceras y ésteres) y lípidos polares (fosfoglicéridos y glucosilglicéridos). Los lípidos polares son importantes componentes estructurales de las membranas celulares que actúan como una barrera selectiva permeable de las células y organelos. De los lípidos no polares, los triacilglicéridos (TAGs) son los más abundantes y sirven como reserva de energía ya que poseen un contenido energético muy superior a los polisacáridos y pueden ser fácilmente catabolizados cuando la célula se encuentra en condiciones adversas [62].

La composición y productividad de lípidos en las microalgas varía de acuerdo a las condiciones de cultivo entre las que se pueden mencionar: composición del medio de cultivo [63], intensidad de luz [64], pH [65], salinidad [12] y temperatura [66]. También pueden depender de la edad del cultivo, por ejemplo, es común observar bajos rendimientos de lípidos en la fase logarítmica, pero tienden a aumentar a finales de la misma y se mantienen estables o incrementan en la fase estacionaria. Durante el crecimiento logarítmico, la mayoría de los lípidos presentes son los polares cuya función es mantener la estructura celular. Por otro lado, en la fase estacionaria, cuando se detiene la división celular, los lípidos no polares aumentan en su concentración [67], pues la biosíntesis *de novo* y la conversión de ciertos lípidos polares de membrana pueden contribuir al aumento general de los triacilglicéridos [68].

El interés en las microalgas para la producción de aceite se debe a que el contenido de lípidos es alto en algunas especies, y al hecho de que la síntesis de éstos, especialmente los triacilglicéridos puede ser regulada mediante las condiciones de cultivo [69]. El contenido total de lípidos en las microalgas puede variar desde 5 hasta 75% con base al peso seco (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Contenido de lípidos y productividad de diferentes especies de microalgas [1].

| Especie de microalga | Contenido de lípidos (% ps) | Productividad de lípidos (mg·L ⁻¹ ·día ⁻¹) | Productividad volumétrica de biomasa (g·L ⁻¹ ·día ⁻¹) |
|---------------------------------|-----------------------------|---|--|
| <i>Botryococcus braunii</i> | 25.0–75.0 | – | 0.02 |
| <i>Chlorella protothecoides</i> | 14.6–57.8 | 1214 | 2.00–7.70 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 5.0–58.0 | 11.2–40.0 | 0.02–0.20 |
| <i>Dunaliella salina</i> | 6.0–25.0 | 116 | 0.22–0.34 |
| <i>Dunaliella tertiolecta</i> | 16.7–71.0 | – | 0.12 |
| <i>Nannochloropsis oculata</i> | 22.7–29.7 | 84.0–142.0 | 0.37–0.48 |
| <i>Neochloris oleoabundans</i> | 29.0–65.0 | 90.0–134.0 | – |
| <i>Phaeodactylum tricorutum</i> | 18.0–57.0 | 44.8 | 0.003–1.9 |
| <i>Porphyridium cruentum</i> | 9.0–18.8/60.7 | 34.8 | 0.36–1.50 |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | 11.0–55.0 | – | 0.004–0.74 |

–: No cuantificado; ps: peso seco

Los triacilglicéridos y ácidos grasos son materia prima potencial para la producción de biocombustibles, debido a su alto contenido energético. Éstos pueden convertirse por

medio de reacciones químicas o enzimáticas en biodiesel [70], un combustible oxigenado. De igual manera, se están desarrollando tecnologías para el aprovechamiento de los triacilglicéridos y ácidos grasos en combustibles hidrocarbonados, que tienen características similares o superiores en comparación con los combustibles fósiles. Estas tecnologías son: pirólisis, craqueo térmico, hidrotatamiento y reacciones de desoxigenación [71].

Debido a que los triacilglicéridos pueden emplearse para obtener biocombustibles, se están investigando métodos para incrementar la producción de los mismos en las microalgas. Convertei *et al.* [72] investigaron el efecto de la temperatura y la concentración de nitrógeno sobre el contenido de lípidos y el crecimiento de cultivos de *Nannochloropsis oculata* y *C. vulgaris*. Los resultados mostraron que el contenido de lípidos de las microalgas está fuertemente influenciado por la variación de los parámetros evaluados, ya que un aumento de la temperatura de 20 a 25 °C prácticamente duplicó el contenido de lípidos de *N. oculata* (7.90 a 14.92%), mientras que un aumento de 25 a 30 °C produjo una disminución del contenido de lípidos en *C. vulgaris* (14.71 a 5.90%). Por otra parte, una disminución del 75% de la concentración de nitrógeno en el medio, con respecto a los valores óptimos para el crecimiento, incrementó las fracciones lipídicas de *N. oculata* de 7.90 a 15.31% y de *C. vulgaris* de 5.90 a 16.41%.

La acumulación de lípidos en *S. obliquus* fue estudiada por Mandal y Mallick [73] a diferentes condiciones de cultivo. Estos autores llegaron a la conclusión de que el biodiesel a partir de *S. obliquus* contiene principalmente ácidos grasos saturados y mono-insaturados, lo que le da alta estabilidad a la oxidación. Gouveia y Oliveira [74] evaluaron seis tipos de microalgas: *C. vulgaris*, *Spirulina maxima*, *Nannochloropsis* sp., *Neochloris oleoabundans*, *S. obliquus* y *Dunaliella tertiolecta* para determinar la cantidad y calidad del aceite y seleccionar la mejor fuente para la producción de biodiesel. De las especies estudiadas en su trabajo, *N. oleoabundans* (microalga de agua dulce) y *Nannochloropsis* sp. (microalga marina) fueron las más adecuadas como materia prima para la producción de biocombustibles, debido a su alto contenido de aceite (29.0% y 28.7%, respectivamente). Además, encontraron que la microalga *S. obliquus* presenta un perfil de ácidos grasos apropiado para la producción de biodiesel.

Ho *et al.* [7] estudiaron la cepa *S. obliquus* (CNW-N) aislada en Taiwán, para evaluar el consumo de CO₂ y la productividad de los lípidos por la estrategia de dos etapas.

Inicialmente, cultivaron la microalga en un medio rico en nutrientes con CO₂ al 10% para promover la acumulación de biomasa, que fue seguida por limitación de nutrientes para inducir la síntesis de lípidos. La productividad de la biomasa, lípidos, y la tasa de consumo de CO₂ fueron 292.50 mg·L⁻¹·d⁻¹, 78.73 mg·L⁻¹·d⁻¹ (38.9 % de contenido de lípidos por peso seco de biomasa), y 549.90 mg·L⁻¹·d⁻¹, respectivamente. Este rendimiento fue superior a los resultados de la mayoría de los estudios relacionados. Estos autores también observaron que bajo limitación de nutrientes, los lípidos de *S. obliquus* (CNW-N) se componían principalmente de los ácidos grasos C16-C18 (89% del total de ácidos grasos), los cuales son apropiados para la producción de biodiesel.

1.5 Efecto de la limitación de nutrientes (N y P) sobre la composición lipídica de microalgas

A pesar de que la cantidad de lípidos que acumula una microalga depende de la especie, las microalgas oleaginosas producen pequeñas cantidades de lípidos bajo condiciones ambientales que favorecen un crecimiento rápido [75]. Sin embargo, se ha reportado en la literatura que las microalgas pueden acumular grandes cantidades de lípidos cuando se encuentran bajo condiciones de estrés, por ejemplo las impuestas por la limitación de nutrientes tales como la limitación de nitrógeno y fósforo, como se describe a continuación.

a) Limitación de la fuente de nitrógeno

Después de la fuente de carbono, el nitrógeno es el elemento más importante que se requiere para la nutrición de microalgas, ya que está directamente asociado con el metabolismo primario, pues forma parte de los ácidos nucleicos y proteínas [26].

A nivel bioquímico, la limitación de nitrógeno influye directamente en el suministro de aminoácidos, que a su vez limita la traducción de ARNm y por lo tanto reduce la tasa de síntesis de proteínas. Bajo condiciones limitadas de nitrógeno también la eficiencia del PSII (fotosistema II) disminuye, principalmente como consecuencia de la disipación de la energía de excitación absorbida en el lecho del pigmento. Como la limitación de nitrógeno

conduce a una reducción del crecimiento y tasas fotosintéticas, también conduce a una reducción de las tasas respiratorias [13].

Reportes en la literatura indican que en algunas microalgas, los ácidos grasos poliinsaturados disminuyen, mientras que los ácidos grasos saturados aumentan en respuesta a la limitación de nitrógeno [76]. Por ejemplo, la microalga verde *B. braunii* cuando es cultivada bajo limitación de nitrógeno (concentración de nitrato de potasio cuatro veces menor en el medio), acumula lípidos como triacilglicéridos y la composición de ácidos grasos cambia, ya que disminuyen los ácidos trienoicos e incrementan los ácidos grasos saturados y monoinsaturados [77].

Ilman *et al.* [78] evaluaron cinco diferentes especies de microalgas del género *Chlorella* bajo deficiencia de N y observaron que en todas ellas aumentó significativamente el contenido de lípidos con excepción en *Chlorella sorokiniana*. Por otra parte, en un estudio realizado por Griffiths *et al.* [6] se reporta que la mayoría de las Chlorophyta tienen un contenido de lípidos entre el 20 % y 30 % del peso seco en un medio rico en nutrientes, pero la privación de N induce la acumulación de lípidos hasta un 64% del peso seco.

b) Limitación de la fuente de fósforo

El fósforo es el tercer nutriente (después del carbono y nitrógeno) más importante para el crecimiento de las microalgas y debe ser suministrado en exceso significativo como fosfatos [26]. Este macronutriente está presente en muchos compuestos biológicos esenciales incluyendo los ácidos nucleicos, lípidos y metabolitos intermediarios [79].

En el caso del fósforo, la limitación de este nutriente en el crecimiento de las algas puede afectar el metabolismo por lo menos en dos aspectos. En primer lugar, hay una limitación de la síntesis de ácidos nucleicos. Esta limitación puede estar a nivel de la replicación del genoma o a nivel de la síntesis de ARN (una forma de control de la transcripción). La limitación puede afectar a la conversión fotosintética de energía por la reducción de la tasa de síntesis de proteínas en el aparato fotosintético. Esta inhibición de la síntesis de proteínas puede tener efectos sobre el metabolismo celular similares a los efectos de la inhibición de la síntesis de proteínas en la limitación de N, excepto que el efecto es indirecto y menos inmediato. En segundo lugar, una respuesta más inmediata a la

limitación de fósforo está en la tasa de síntesis y regeneración de los sustratos en el ciclo de Calvin-Benson, reduciendo así la tasa de utilización de la luz para la fijación de carbono [13]. Las células pueden sufrir también una disminución de los fosfolípidos de membrana que se convierten a lípidos neutros, aunque los mecanismos bioquímicos en estos sistemas son poco conocidos [80]. Por otra parte, la incapacidad para producir ácidos nucleicos en la división celular, da lugar a un aumento en el volumen de la célula [13].

En un trabajo realizado por Sheek y Rady [81] se demuestra que la división celular, el contenido de clorofila y la actividad fotosintética disminuyen durante el período de limitación de fósforo, mientras que la biomasa seca aumenta al final de la incubación. De igual manera observaron un aumento en ácidos grasos insaturados, que es un indicador de la fluidez de la membrana de las células ante la limitación de fósforo. También observaron un aumento del volumen celular, del grosor de la pared celular y de los compuestos de almacenamiento, tales como los lípidos.

Estudios previos reportan que la limitación de fósforo induce la acumulación de lípidos, principalmente triacilglicéridos. Khozin y Cohen [10] observaron que la limitación de fósforo provoca cambios significativos en los ácidos grasos y en la composición lipídica de *Monodus subterraneus*, pues la ausencia de este nutriente redujo significativamente los fosfolípidos de 8.3 a 1.4 % del total de lípidos, mientras que los triacilglicéridos aumentaron de 6.5 a 39.3 % del total de lípidos. Por su parte, Reitan *et al.* [82] evaluaron el cultivo de las microalgas marinas *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Nannochlorosis atomus*, *Tetraselmis* sp. y *Gymnodinium* sp. bajo limitación de fósforo. Estos autores observaron un aumento en la acumulación de lípidos en cinco especies, pero disminuyó en las microalgas *N. atomus* y *Tetraselmis* sp. Además, observaron que la limitación de este nutriente indujo un aumento en la concentración de los ácidos grasos C16:0 y C18:1, los cuales son importantes para la producción de biodiesel.

1.6 *Scenedesmus obliquus*

Entre las microalgas verdes se encuentra el género *Scenedesmus*, que se puede hallar en cuerpos de agua dulce en todo el mundo, e incluso en el suelo. Su naturaleza cosmopolita ilustra la amplia gama de condiciones ambientales que estos organismos pueden tolerar, haciendo uso de su plasticidad fenotípica. Debido a sus requerimientos nutricionales simples y rápidas tasas de crecimiento, los cultivos de *Scenedesmus* son fáciles de mantener en el laboratorio [83].

Una colonia de este género está compuesta de dos, cuatro, ocho o 16 células. Pero también puede presentarse en forma unicelular [84]. Las algas verdes de este género se dividen en dos grupos [83]:

- a) El grupo sin espinas (las “obliquus”). Son células fusiformes, que pueden estar agrupadas en colonias y a medida que envejecen se van separando en formas unicelulares. Generalmente se reproducen por forma asexual, pero también pueden reproducirse sexualmente por fusión de isogametos biflagelados.
- b) El grupo con espinas. Son células alargadas, agrupadas en colonias con espinas en los extremos. Se reproducen por forma asexual.

Entre las microalgas verdes del género *Scenedesmus* se encuentra *S. obliquus*, una especie que se agrupa en colonias de 4, 8 o 16 células (Figura 1.4). Los lípidos de esta microalga representan de 11 a 55 % del peso seco. Estos lípidos están formados en su mayoría por triacilglicéridos, siendo los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos los que integran la mayor parte de los lípidos presentes en esta microalga (Tabla 1.7).

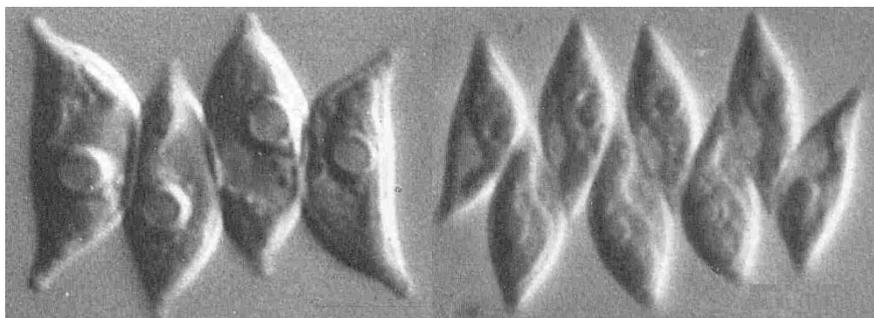


Figura 1.4. Colonias de *S. obliquus* [85].

Tabla 1.6. Clasificación taxonómica de *Scenedesmus obliquus* [86].

| Clasificación | |
|-------------------|-------------------------|
| <i>Reino</i> | <i>Plantae</i> |
| <i>Subreino</i> | <i>Viridaeplantae</i> |
| <i>Filum</i> | <i>Chlorophycophyta</i> |
| <i>Clase</i> | <i>Chlorophyceae</i> |
| <i>Orden</i> | <i>Sphaeropleales</i> |
| <i>Familia</i> | <i>Scenedesmaceae</i> |
| <i>Subfamilia</i> | <i>Scenedesmoidea</i> |
| <i>Género</i> | <i>Scenedesmus</i> |
| <i>Especie</i> | <i>obliquus</i> |

Tabla 1.7. Composición de ácidos grasos de los lípidos de la microalga *Scenedesmus obliquus* [87].

| Acido graso | % peso seco |
|-------------|-------------|
| 14:0 | 0.4 |
| 16:0 | 19.4 |
| 16:1 | 1.9 |
| 16:2 | 1.7 |
| 16:3 | 1.0 |
| 16:4 | 7.2 |
| 18:0 | 1.0 |
| 18:1 | 20.3 |
| 18:2 | 13.0 |
| 18:3 | 17.5 |
| 18:4 | 2.1 |

1.8 Justificación

Las microalgas han demostrado tener un gran potencial como fuente de materia prima para la producción de biocombustibles. Lo anterior debido a que muchas de ellas son ricas en aceite, tienen alta eficiencia fotosintética, se multiplican rápido y requieren una mínima extensión superficial para su cultivo, comparada con los cultivos agrícolas [4]. En la mayoría de los casos, la producción de biocombustibles se basa en especies ya identificadas que han demostrado ser adecuadas en cuanto a su contenido en lípidos o productividad. Sin embargo, en algunos casos, este enfoque no ofrece una solución apropiada, pues también se necesita un perfil de lípidos apropiado para su empleo como biocombustible, por lo que la búsqueda de más especies de microalgas es lo más indicado [1]. Se ha reportado que la microalga *S. obliquus* presenta un perfil de ácidos grasos apropiado para la producción de biodiesel (16 y 18 átomos de carbono) [74, 87], similares a los aceites vegetales. Por ello, en el presente estudio se trabajó con *S. obliquus* (SCO1), una microalga verde aislada en Ensenada, Baja California, México. Existen trabajos previos de otras cepas de esta especie de microalga para la producción de biodiesel [7, 73, 74], sin embargo, la cepa de *S. obliquus* (SCO1) no ha sido estudiada en la generación de biocombustibles. Por otro lado, es necesario investigar el potencial de otras especies del género *Scenedesmus* nativas del Estado de Yucatán, ya que la selección de especies adaptadas a las condiciones climáticas locales podría ayudar a obtener altos rendimientos de biomasa y lípidos. En este sentido, también se estudió la cepa *Scenedesmus* sp. aislada del Parque Ecológico del Poniente, en Mérida, Yucatán, México, de la cual no se ha evaluado su uso como materia prima para la producción de biocombustibles.

Después de la fuente de carbono, el nitrógeno y el fósforo son las fuentes más importantes para la nutrición de microalgas, ya que están directamente asociados con el metabolismo primario y su limitación induce la acumulación de lípidos. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la limitación de nitrógeno y fósforo en la producción de lípidos en cultivos de las microalgas verdes *S. obliquus* y *Scenedesmus* sp.

1.9 Hipótesis

Es posible inducir un aumento de la producción de lípidos en cultivos de las microalgas *S. obliquus* y *Scenedesmus* sp. mediante la limitación de nitrógeno y fósforo.

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la limitación de N y P en la producción de lípidos en cultivos de las microalgas verdes *S. obliquus* y *Scenedesmus* sp.

1.10.2 Objetivos específicos

Determinar el medio de cultivo y el tiempo necesarios para la acumulación de biomasa de las microalgas *S. obliquus* y *Scenedesmus* sp.

Evaluar el efecto de la limitación de nitrógeno y fósforo en la acumulación de lípidos obtenidos a partir del cultivo de *S. obliquus* y *Scenedesmus* sp.

Capítulo 2.

Materiales y Métodos

2.1 Estrategia experimental

Inicialmente, se evaluaron cinco formulaciones de medios de cultivo: Bold's Basal modificado (BB) [88], Bold's Basal modificado sin NaCl (BBs/s), BG11, Fitzgerald (FTZ) [8], y Tris-Acetato-Fosfato (TAP) [89], para cada una de las especies de microalgas: *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp. Se seleccionó el medio de cultivo donde se acumuló la mayor concentración celular en el menor tiempo. Posteriormente, se realizó una curva de crecimiento con el medio de cultivo seleccionado para cada microalga, a partir de la cual se determinó el día del cultivo en que las especies llegan a la fase estacionaria (al inicio de esta fase las microalgas tienen la mayor densidad de población). Luego se evaluó el efecto de la limitación de nitrógeno (-N) en el medio seleccionado al inicio de la fase estacionaria. De igual manera, se repitió el mismo proceso para el medio seleccionado con limitación de la fuente de fósforo (-P). Finalmente, se determinó la acumulación de biomasa y lípidos de ambas microalgas (Figura 2.1).

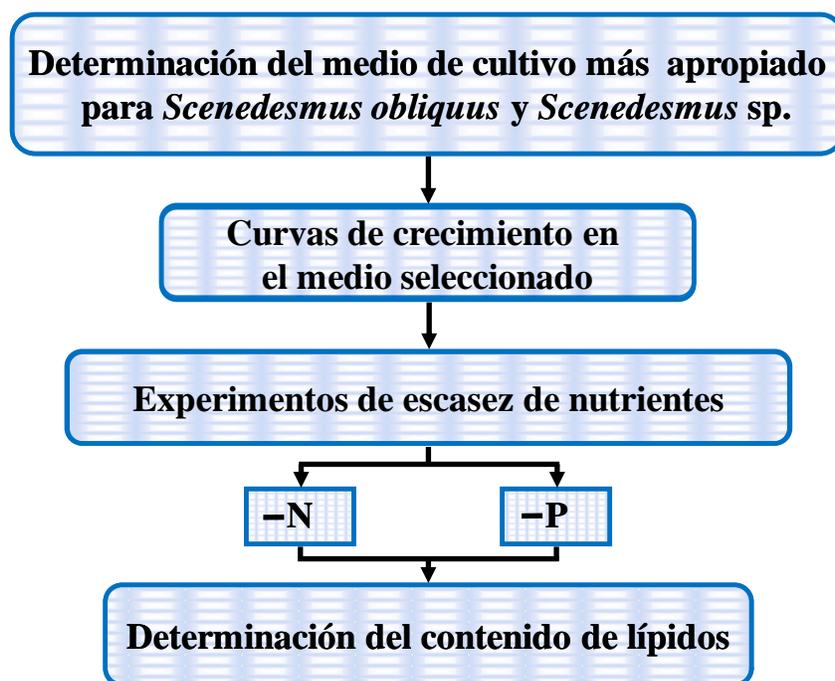


Figura 2.1. Esquema de la estrategia experimental.

2.2 Cepas de microalgas

S. obliquus (SCO1) fue adquirida de la colección de cultivos de algas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California. Esta microalga fue aislada de una muestra de agua proveniente de un ambiente hiper-eutrófico de Ensenada, BC.

Scenedesmus sp. fue proporcionada por la Q.F.B. Silvia López Adrián, y fue aislada del Parque Ecológico del Poniente, en Mérida, Yucatán.

2.3 Medios de cultivos

Los medios de cultivo evaluados fueron los siguientes:

- Medio Bold's Basal (BB) modificado [88]. Se cambió MoO_3 por $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y el $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
- Medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP, por sus siglas en inglés) [89].
- Medio Fitzgerald (FTZ) modificado [8]. Se cambió EDTA tri-Na por EDTA sal de sodio férrico, no se agregaron KBr, $\text{CdCl}_2 \cdot (5/2) \text{H}_2\text{O}$ y $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$.
- Medio BG₁₁ modificado [88]. 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 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

La formulación completa de los medios se encuentra en el Anexo 1.

Para la conservación, mantenimiento y propagación de las cepas de microalgas, se utilizó el medio Bold's Basal en estado semisólido con las concentraciones de las soluciones indicadas en el Anexo 1, añadiendo además 15 g L^{-1} de agar-agar.

En todos los medios utilizados se ajustó el pH a 7.0 con KOH 1M ó HCl 1M y posteriormente se esterilizó en autoclave a 1 atm por 20 minutos.

Por otra parte, el medio Bold's Basal es el único que contiene NaCl en su composición, por lo que se evaluó el mismo medio con y sin NaCl (BB_{s/s}).

2.4 Cultivo de las microalgas

Para tener un control de la densidad del inóculo en los cultivos se requirió de un precultivo en estado líquido. Este se llevó a cabo inoculando el medio Bold's Basal en estado líquido con una colonia de la microalga en estudio, proveniente del mismo medio en estado semisólido. El tiempo de incubación en estado semisólido fue aproximadamente 15 días. Posteriormente los cultivos experimentales se inocularon a una concentración de $10,000 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$ provenientes del precultivo antes descrito. Los precultivos fueron incubados por un tiempo de seis días en el caso de *S. obliquus* y cinco en *Scenedesmus* sp. Las condiciones de cultivo tanto para los cultivos en medio semisólido como para los cultivos en medio líquido (precultivos o cultivos experimentales) fueron las siguientes: temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo 16:8 (luz:oscuridad) a una intensidad lumínica de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 140 rpm en un agitador orbital.

2.5. Métodos de aislamiento

a) Aislamiento por estría cruzada en placa.

Para realizar la descontaminación de los cultivos, se tomó un pequeño volumen (se sumerge el asa de siembra en el medio líquido) de un cultivo líquido y se distribuyó a través del medio de cultivo semisólido, utilizando un patrón llamado de estría cruzada (Figura 2.2) y se utilizaron las condiciones de incubación antes descritas.

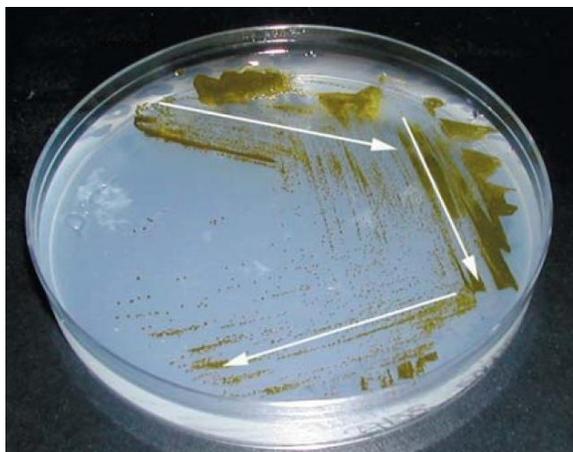


Figura 2.2 Aislamiento por estría cruzada [88].

b) Aislamiento por diluciones

Otro método que se utilizó para realizar la descontaminación de los cultivos fue por medio de diluciones. Para esto se tomó 1 mL del cultivo contaminado y se diluyó en 9 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se tomó 1 mL de la primera dilución y se diluyó en 9 mL de agua destilada. Se repitió el mismo proceso hasta tener 5 diluciones (Figura 2.3). Posteriormente se tomó una alícuota de cada dilución y se sembró por el método de estría cruzada en platos de Petri con medio de cultivo semisólido y se incubó en las condiciones de cultivo antes descritas hasta observar crecimiento.

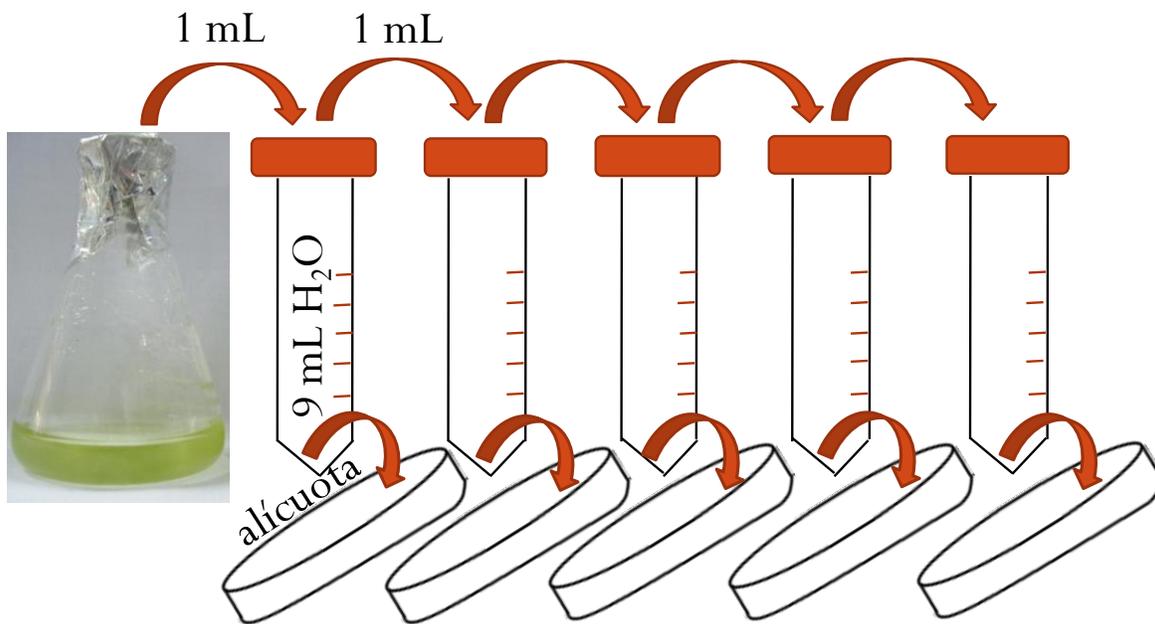


Figura 2.3. Esquema del método de aislamiento por dilución.

2.6 Conteo celular

Para determinar la concentración celular se empleó la técnica siguiente. Se tomó una muestra de 900 μL y las células se fijaron añadiendo 100 μL de una solución de yoduro de lugol (Anexo 2), se agitó durante 5 minutos en una agitadora orbital a 140 rpm. Mediante un microscopio óptico, se observó con un objetivo de 40X, en una cámara de Neubauer y se contó el número de células de microalgas de los campos señalados con la letra “R” en la figura 2.4, posteriormente se aplicó la siguiente fórmula [90]:

$$[\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}] = \text{total de células en 5 cuadrantes (50,000)}(\text{dilución})$$

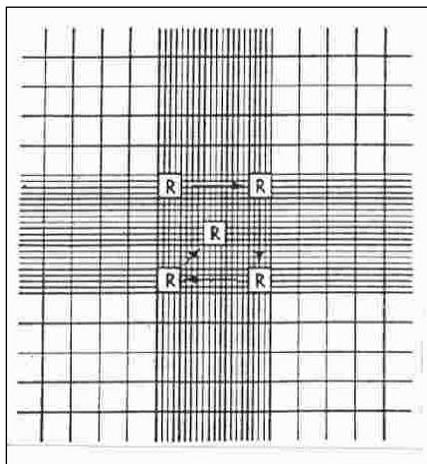


Figura 2.4. Esquema de los cuadrantes evaluados en la cámara de Neubauer [90].
R: Cuadrantes evaluados

2.7 Determinación del medio más apropiado para la acumulación de biomasa

Para determinar el medio más apropiado de cultivo para la acumulación de biomasa, las dos microalgas objeto de estudio se cultivaron en los medios BB, BB_{s/s}, BG 11, FTZ y TAP, en matraces de 50 mL, con 10 mL de medio hasta alcanzar la fase de muerte o lisis celular. Se tomaron muestras cada 48 h y se determinó la concentración celular por medio de conteo celular en una cámara de Neubauer. Los cultivos se realizaron por triplicado.

2.8 Curvas de crecimiento

La curva de crecimiento se realizó con un doble propósito. En primer lugar, para determinar el tiempo de cultivo (inicio de la fase estacionaria), en el cual se presenta la máxima concentración celular de las microalgas, que sirvió como punto de inicio para los experimentos de limitación de nitrógeno y fósforo. En segundo lugar, para conocer la duración de la fase estacionaria, y calcular el tiempo de incubación de las microalgas en el medio con limitación de nitrógeno y fósforo.

Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo en matraces de 250 mL con 50 mL de medio TAP y se tomaron muestras cada 24 horas, hasta alcanzar la fase de muerte celular. Se determinó la concentración celular con respecto al tiempo y el peso seco de la biomasa al final de la fase exponencial. Los experimentos se realizaron con tres matraces por experimento.

2.9 Recolección y productividad de biomasa

La colecta de la biomasa se realizó mediante centrifugación utilizando una centrífuga Eppendorf modelo 5804 R a 4000 rpm, durante siete minutos, con una temperatura de 25 °C y rotor para tubos Falcon. La biomasa se congeló a -80 °C por 24 h y se deshidrató en una liofilizadora Labconco Modelo 77530 por 24h. La biomasa seca se pesó en una balanza analítica Adventurer Ohaus.

La productividad de biomasa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) fue calculada de la variación de la biomasa (mg L^{-1}) con respecto al tiempo, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$p = (X_1 - X_0) (t_1 - t_0)^{-1}$$

Donde X_1 y X_0 son las concentraciones de la biomasa ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con respecto al día de cultivo t_1 y t_0 , respectivamente.

2.10 Experimentos de limitación de nitrógeno y fósforo

Para evaluar el efecto de la limitación de nitrógeno en la producción de lípidos de ambas microalgas, primero se recuperó la biomasa del medio de cultivo por centrifugación. Posteriormente, se resuspendió en el medio TAP con limitación de N. Cabe señalar que la solución stock de metales traza de Hutner contenía $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, la cual también es una fuente de nitrógeno y no se retiró del medio, por lo que la concentración final de nitrógeno fue de $0.011 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el medio de cultivo. Posteriormente, se incubó por seis días para *S. obliquus* y por cinco días para *Scenedesmus* sp., a una temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo 16:8 (luz:oscuridad) en un agitador orbital a 140 rpm. Como control se utilizó una muestra en medio TAP completo. Se repitió el mismo proceso para los experimentos de limitación de fósforo (Figura 2.5).

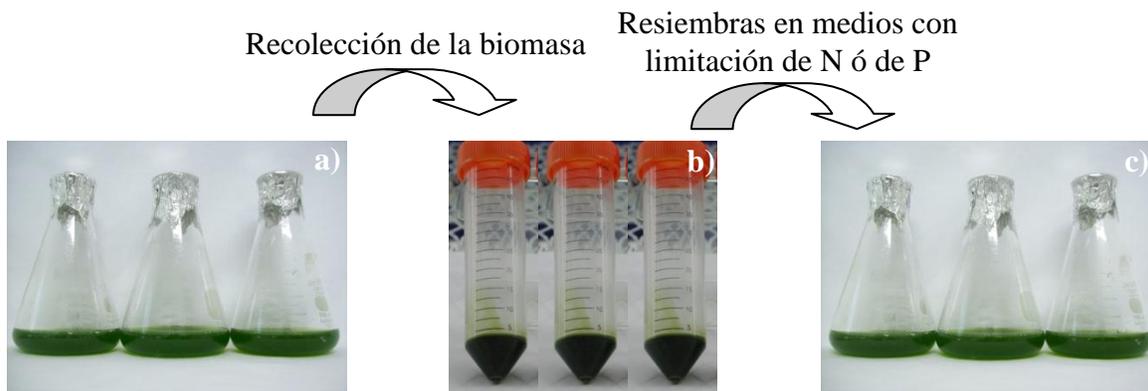


Figura 2.5. Estrategia para los experimentos de limitación de nitrógeno o fósforo en el medio de cultivo. a) Cultivos para crecimiento de las microalgas. b) Recuperación de la biomasa por centrifugación. c) Resiembra de la biomasa en el medio de cultivo con limitación de nitrógeno o fósforo.

2.11 Extracción de lípidos

Los lípidos totales fueron extraídos mediante lixiviación con cloroformo-metanol 2:1 v/v. Se añadió 15 mL de la mezcla de solvente por cada 38 mg de biomasa seca. Las extracciones se realizaron en matraces de 50 mL, en un agitador orbital a 140 rpm, a 38 °C por 3 horas [91]. La extracción se realizó tres veces para *S. obliquus* y dos veces para *Scenedesmus* sp. Posteriormente se recuperó el lixiviado, se evaporaron los solventes en una campana de extracción de vapores, se secó el extracto lipídico a 60 °C por una hora y se pesó.

La productividad de lípidos ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) fue calculada en base al extracto de lípidos obtenido por unidad de tiempo en días.

2.12 Cromatografía de gases-masas

El perfil de lípidos se determinó mediante cromatografía de gases masas, para lo cual se utilizó una columna HP-ULTRA 2 (30 m x 0.32 mm ID x 0.5 m de espesor de película) con las siguientes condiciones: flujo de gas acarreador He: $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, la temperatura del horno fue como sigue: temperatura inicial de 120 °C por 1 min, una rampa de $15 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 180 °C, otra de $7 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 230 °C y la última rampa de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

min^{-1} hasta $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo esta temperatura por 60 min. El volumen de inyección fue de $1\text{ }\mu\text{L}$. Las muestras fueron disueltas en $300\text{ }\mu\text{L}$ de heptano y transesterificadas con $300\text{ }\mu\text{L}$ de metóxido sódico al 0.35% (p/v) y acetato de etilo ($300\text{ }\mu\text{L}$) a 45°C durante 90 minutos [92].

Capítulo 3.

Efecto de la limitación de N y P en la producción de lípidos en *Scenedesmus obliquus*

3.1 Introducción

Los lípidos totales tienden a incrementarse con el envejecimiento celular de las microalgas [93] o con la incubación de las mismas bajo limitación de nutrientes u otros factores abióticos como salinidad y temperatura [6, 12, 94]. Estos lípidos están formados en su mayoría por lípidos neutros, principalmente triacilglicéridos. La biosíntesis *de novo* y la conversión de ciertos lípidos polares de membrana pueden contribuir al aumento general de los triacilglicéridos [68]. Varios estudios reportan que cultivos de microalgas bajo limitación de N aumentan la acumulación de lípidos [6, 72, 78]. Sheehan *et al.* [95] reportaron que bajo limitación de N, la tasa de producción de todos los componentes de la célula es menor y la producción de lípidos aumenta. Esto se debe a una marcada reorientación del metabolismo celular hacia la biosíntesis de lípidos [96]. Por su parte, el fósforo es esencial para los procesos celulares relacionados con la bio-conversión de energía (por ejemplo, la fotofosforilación). Por lo tanto, la limitación de P puede tener un impacto severo sobre la fotosíntesis ya que se reduce la tasa de síntesis de proteínas, por ejemplo la Rubisco, la cual se requiere en grandes cantidades en la fotosíntesis, reduciendo de esta manera, la tasa de fijación de CO₂ [54]. Ante estas circunstancias las microalgas pueden almacenar lípidos como fuente de reserva de energía [81]

En el presente trabajo se utilizó la cepa *Scenedesmus obliquus* (SCO1), la cual no se ha estudiado previamente para la generación de biocombustibles. Estudios previos han reportado que otras cepas de *S. obliquus* presentan un potencial como materia prima para su empleo en la producción de biodiesel. Por ejemplo, Gouveia y Oliveira [74] reportaron que la cepa *S. obliquus* (FCTU Coimbra) presenta un perfil de ácidos grasos apropiados para la producción de biodiesel, ya que presenta bajo contenido de ácidos linoleico y poliinsaturados (ácidos grasos con más de cuatro insaturaciones) y cumple con la norma EN14214 que especifica un límite de 12 y 1% para estos ácidos grasos, respectivamente. Mandal y Mallick [73], reportaron que la biomasa de la cepa *S. obliquus* (SAG 276-3a) puede incrementar su contenido de lípidos hasta en un 43 % con base al peso seco,

compuesto principalmente de ácido palmítico y oleico, lo que hace a esta cepa adecuada como materia prima para la producción de biodiesel. Ho *et al.* [7] reportaron que con la cepa *S. obliquus* (CNW-N), bajo condiciones de limitación de nutrientes, los triacilglicéridos aumentan y se componen principalmente de ácidos grasos C16 y C18 (que representan el 89% del total de ácidos grasos). Por lo tanto el objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la limitación de N y P en la producción de lípidos en el cultivo de la microalga verde *S. obliquus* (SCO1).

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Medios de cultivo

Diversos medios de cultivo se han desarrollado y utilizado para el aislamiento y cultivo de algas de agua dulce. Algunos de ellos son modificaciones formuladas después de un estudio detallado sobre las necesidades de nutrientes del organismo, algunos se derivan del análisis del agua en el hábitat natural, algunos se formulan después de un estudio detallado sobre las necesidades de nutrientes del organismo, y otros se han establecido tras el examen de los parámetros ecológicos [88]. Se evaluaron cuatro medios de cultivo diferentes utilizados en microalgas verdes, para determinar el más apropiado para la acumulación de biomasa, los cuales se mencionan a continuación.

El medio Bold's Basal fue originalmente derivado de una versión modificada del medio Bristol y carece de vitaminas [88]. Este medio es útil para el cultivo de varias especies de microalgas incluyendo *S. obliquus* [97]. Cabe mencionar que entre los medios evaluados, el medio Bold's Basal es el único que contiene NaCl en su composición, por lo que se evaluó el mismo medio, pero sin esta sal para observar el efecto sobre la concentración celular.

El medio BG11 fue derivado del medio número 11, para el cultivo de algas verde-azules [88]. El principal cambio del medio número 11 es el incremento de tres veces la fuente de nitrógeno (NaNO_3). Este medio también es empleado en el cultivo de *S. obliquus* [98].

El medio Fitzgerald es otro medio de cultivo empleado en microalgas verdes. Sin embargo, no se encuentra información disponible de su empleo en el cultivo de *S. obliquus*. Su utilización en este estudio resulta interesante pues se ha utilizado para el cultivo de otras microalgas verdes como *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophila* y *Chlamydomonas reinhardtii* [8, 91, 92].

En un estudio realizado por Herrera-Valencia *et al.* [92] se ha observado que en el medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato) se acumula una mayor concentración celular de *C. reinhardtii* y *C. saccharophila* cuando es comparado con los medios mencionados

anteriormente, por lo que resulta de interés su evaluación en este trabajo. Este medio se ha utilizado en otros estudios para el cultivo de *S. obliquus* [99].

Debido a que algunas microalgas pueden consumir carbono orgánico para su desarrollo e incrementar la tasa de crecimiento [50], en el presente trabajo se evaluaron los cinco diferentes medios de cultivo con y sin ácido acético como fuente carbono, añadiéndoles 1 mL por litro de solución, para determinar el efecto de este nutriente sobre la concentración celular.

3.2.2 *Scenedesmus obliquus* (SCO1)

S. obliquus (SCO1) fue aislada originalmente de un ambiente hiper-eutrófico en Ensenada, Baja California, México. Estudios previos sobre esta cepa en particular reportan que puede ser empleada para tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales [100, 101, 102, 103]. Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con información disponible de su uso como materia prima para la producción de algún biocombustible.

3.2.3 Experimentos de limitación de N y P

Para evaluar el efecto de la escasez de nitrógeno en la producción de lípidos en *S. obliquus*, primero se recuperó la biomasa del medio de cultivo (medio TAP con todos los nutrientes) por centrifugación. Posteriormente, se resuspendió en el medio TAP con limitación de N (este medio se preparó eliminando NH_4Cl del medio TAP, Anexo I), cabe señalar que la solución stock de metales traza de Hutner contiene $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, que también es una fuente de nitrógeno, quedando la concentración de este nutriente en $0.011 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el medio de cultivo. Luego, se incubó la microalga por seis días, a una temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo 16:8 (luz:oscuridad) en un agitador orbital a 140 rpm. Como control se utilizó un cultivo en medio TAP completo (concentración normal de N). Para los experimentos de limitación de P, se repitió el mismo proceso, pero a diferencia del anterior, el K_2HPO_4 y KH_2PO_4 del medio TAP fueron remplazados por una concentración equimolar de KCl . Los experimentos se realizaron con tres matraces por experimento. Cada experimento se realizó dos veces.

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Descontaminación de la cepa

Inicialmente se obtuvieron del CICESE cuatro tubos con 50 mL de cultivo de la microalga *S. obliquus* en medio Bold's Basal (Figura 3.1a). Posteriormente se procedió a cultivarla en cajas de Petri con el mismo medio en estado semisólido (Figura 3.1b). También se cultivó en medio TAP líquido y se apreció que a partir del tercer día empezó a quedar turbio. Al observarse al microscopio, se observó que el cultivo presentaba contaminación bacteriana, por lo que posiblemente la cepa vino contaminada, y al cultivarse esta microalga en el medio TAP, se pudo haber favorecido el crecimiento de la contaminación dado que este medio contiene ácido acético como fuente de carbono. Por lo tanto, la microalga fue descontaminada utilizando el método de aislamiento por estrías cruzadas en medio BB semisólido, y como se puede observar en la Figura 3.2, se logró obtener un cultivo de *S. obliquus* sin contaminación.

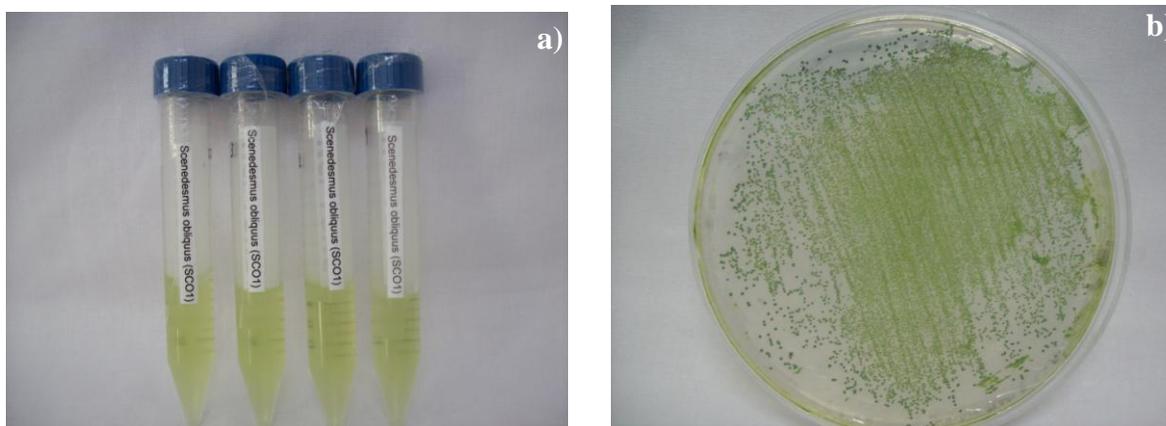


Figura 3.1 Microalga *Scenedesmus obliquus* en medio BB en

a) estado líquido y b) semisólido.

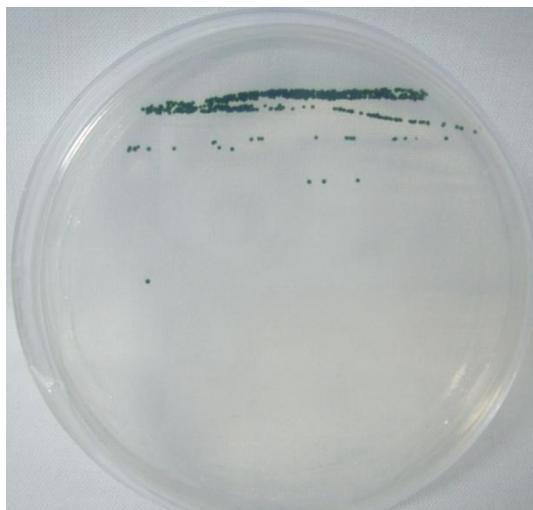


Figura 3.2 Cultivo axénico de *Scenedesmus obliquus*.

3.3.2 Evaluación de los diferentes medios con ácido acético como fuente de carbono orgánico

Se evaluaron las cinco formulaciones de medios de cultivo descritos anteriormente, añadiéndoles 1 mL de ácido acético como fuente de carbono, pues se ha reportado que el cultivo heterotrófico de microalgas ofrece la posibilidad de aumentar la productividad de biomasa [104]. Como se observa en la Figura 3.3, en los primeros dos días los cultivos de *S. obliquus* en los diferentes medios se encontraban en la fase lag, pero después del segundo día, se presentó un aumento gradual del número de células. El medio que propició una mayor concentración celular fue el TAP. En este medio se alcanzó al sexto día una densidad de 25.5×10^6 células·mL⁻¹. Esto puede deberse a que en el medio TAP la fuente de N se encuentra bajo la forma de amonio, mientras que en los demás como nitrato. Se ha reportado que algunas especies de microalgas crecen más rápido cuando la fuente de N es amonio ya que se requiere menos energía para su absorción [50].

El medio de cultivo FTZ fue el segundo con mayor concentración celular (9.2×10^6 células·mL⁻¹) de aproximadamente la mitad de lo obtenido con el TAP a los 10 días de cultivo. Le siguen los medios de cultivo BB s/s y BB, los cuales alcanzaron concentraciones de 8.7×10^6 y 7.5×10^6 células·mL⁻¹, respectivamente. Finalmente, el medio de cultivo con menor concentración celular fue el BG11 con 4.5×10^6 células·mL⁻¹ a los ocho días de cultivo.

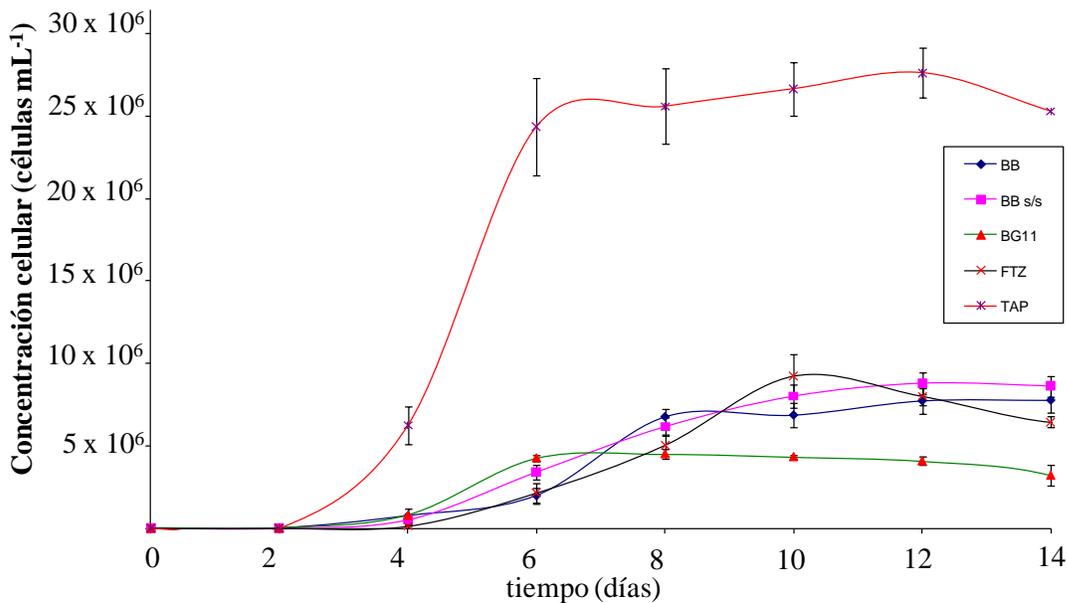


Figura 3.3 Evaluación del efecto de los diferentes medios de cultivo con ácido acético como fuente de carbono en el cultivo de *Scenedesmus obliquus*. Medios evaluados: BB, medio Bold's Basal. BBs/s, medio Bold's Basal sin NaCl. TAP, medio Tris-Acetato-Fosfato. FTZ, medio Fitzgerald. BG11, medio BG11.

3.3.3 Evaluación de los diferentes medios sin fuente de carbono orgánico

Se evaluaron los cinco diferentes medios, pero sin fuente de carbono orgánico, con el fin de determinar el efecto de la ausencia de ésta nutriente sobre la concentración celular. Los resultados muestran que el cultivo de *S. obliquus* en medio TAP alcanza una concentración celular de 24.8×10^6 células·mL⁻¹ a los 14 días de cultivo (Figura 3.4), lo que significa que sin ácido acético como fuente de carbono a esta microalga le toma 2.3 veces el tiempo para alcanzar la misma concentración que con la fuente de carbono orgánico. Se ha demostrado que la adición de ácido acético incrementa la tasa de crecimiento y facilita la absorción de amonio en *S. obliquus* (UTEX 78) debido al incremento de la actividad de la enzima isocitrato liasa, la cual es clave para la regulación del ciclo del glioxilato responsable del catabolismo del acetato [105]. Estos resultados sugieren que esta especie puede crecer mixotróficamente, tal como lo reporta Combres *et al.* [105].

Como se muestra en la Figura 3.4, los medios de cultivo con mayor concentración después del TAP son el BB s/s y BG11 con 13.5×10^6 y 13.4×10^6 células·mL⁻¹, respectivamente a los 14 días de cultivo. Los medios de cultivo BB y FTZ alcanzaron concentraciones de 11.4×10^6 y 8.9×10^6 células·mL⁻¹, respectivamente.

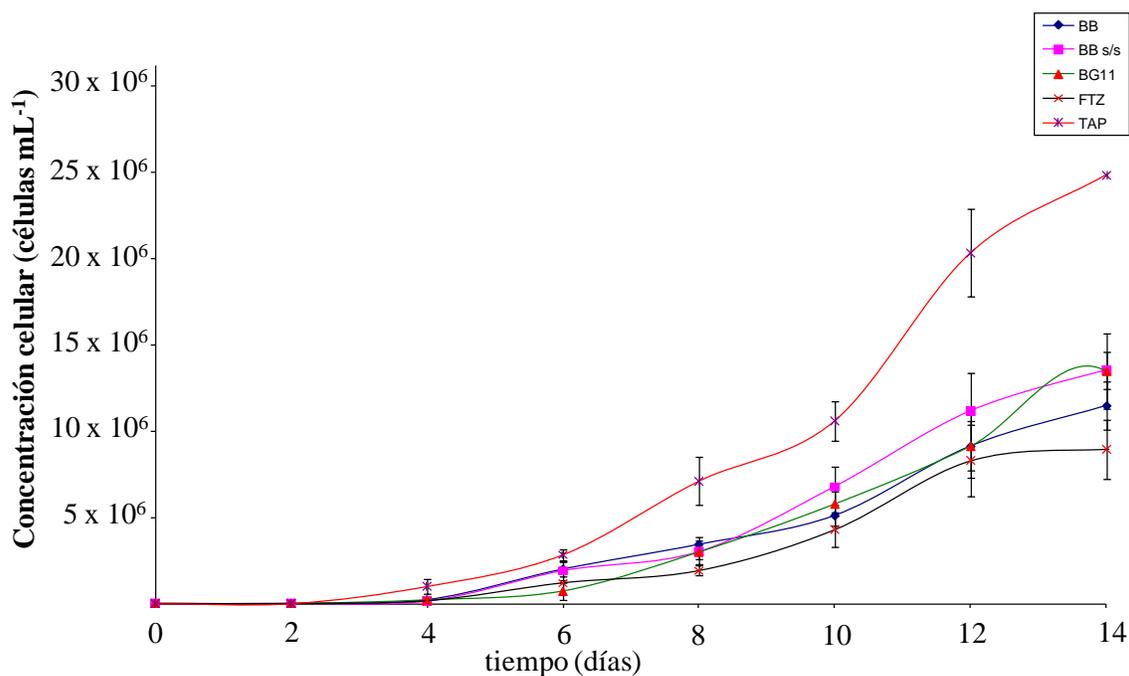


Figura 3.4 Evaluación del efecto de los diferentes medios de cultivo sin fuente de carbono orgánico en el cultivo de *Scenedesmus obliquus*. Medios evaluados: BB, medio Bold's Basal. BBs/s, medio Bold's Basal sin NaCl. TAP, medio Tris-Acetato-Fosfato. FTZ, medio Fitzgerald. BG11, medio BG11

3.3.4 Determinación del tiempo para la aplicación del estrés

La evaluación de los diferentes medios en un volumen de 10 mL, mostró que el medio TAP fue el más indicado para el cultivo de *S. obliquus* (SCO1) ya que presentó la mayor concentración celular. Por lo tanto, se realizó una curva de crecimiento en un volumen de 50 mL de medio TAP, ya que a este volumen se llevarían a cabo los experimentos de limitación de N y P. Como se muestra en la Figura 3.5, a partir del cuarto día la microalga presentó un crecimiento exponencial, en 24 horas aproximadamente cuadruplicó su densidad celular (19.35×10^6 células·mL⁻¹), y al sexto día inició la fase estacionaria, que tuvo una duración de alrededor de seis días.

La realización de la curva de crecimiento tuvo un doble propósito. En primer lugar, para determinar el inicio de la fase estacionaria, que fue de seis días, este tiempo sirvió como punto de inicio para los experimentos de limitación de nitrógeno y fósforo. En segundo lugar, para conocer la duración de la fase estacionaria, que fue de seis días (Figura 3.5) y fue el tiempo empleado en los tratamientos con limitación de nitrógeno y fósforo.

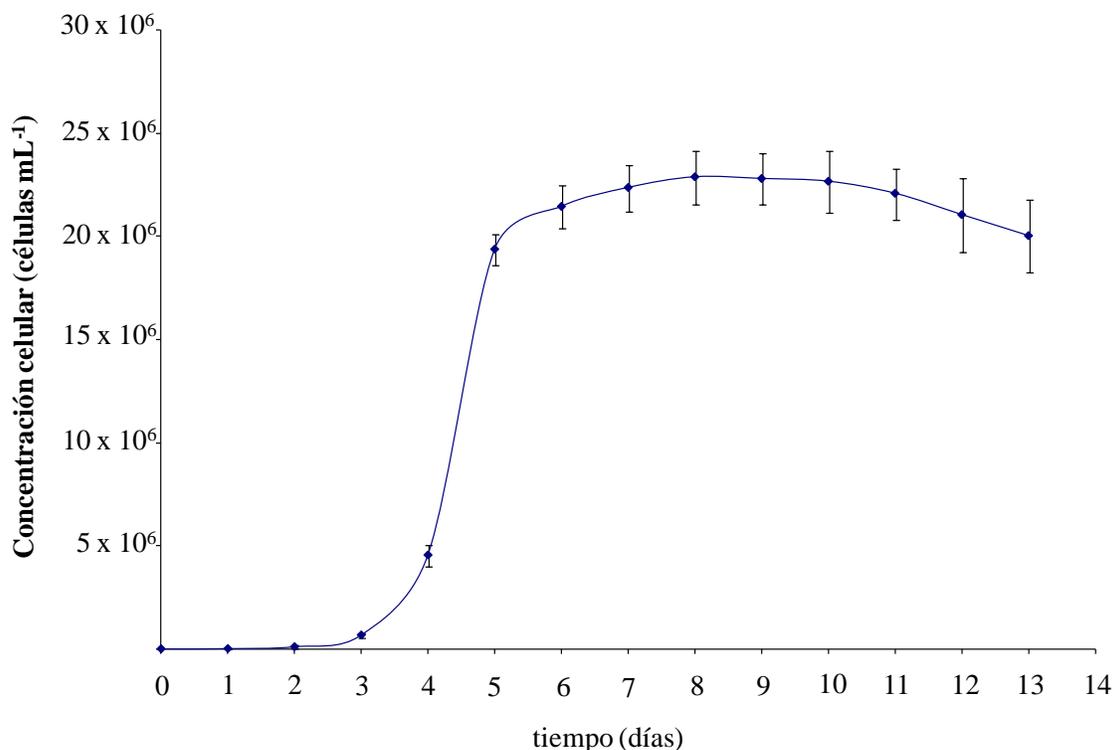


Figura 3.5 Curva de crecimiento de *Scenedesmus obliquus* en medio TAP.

En un estudio realizado por Mandal y Mallick [73] con *S. obliquus*, se observó que esta microalga alcanzó la fase estacionaria a los 21 días de cultivo en el medio N11, este tiempo les sirvió para recolectar la biomasa y cultivarlas por 7 días con limitación de N. En el presente trabajo se alcanzó la fase estacionaria a los seis días, esta diferencia puede deberse al medio de cultivo empleado (medio TAP con fuente de carbono orgánica), ya que las demás condiciones de cultivo fueron similares.

3.3.5 Efecto de la limitación de N y P

3.3.5.1 Concentración celular

Como parte de la evaluación de los cultivos durante los experimentos de limitación de N y P, se determinó la concentración celular. Los resultados obtenidos muestran que después de seis días de estrés, tanto los experimentos de limitación de N, P y el control (medio completo) no presentaron una diferencia significativa (Figura 3.6), los valores fueron 31.6×10^6 , 31.1×10^6 y 31.4×10^6 células·mL⁻¹, respectivamente.

En la mayoría de los estudios sobre limitación de nutrientes se reporta una disminución de la división celular [62]. No obstante, en el presente trabajo se observó un aumento en la concentración celular entre el inicio y el fin los tratamientos de estrés de 20.1×10^6 a 31.4×10^6 células·mL⁻¹. Este comportamiento ya se ha reportado en un estudio realizado por Tang *et al.*, [106]. Estos autores observaron un incremento de la concentración celular después de la incubación bajo limitación de N (1.2×10^8 a 2.5×10^8 células·mL⁻¹) en *Chlorella minutissima* y mencionan que es posible que el N se haya acumulado en las microalgas durante el período de la fase exponencial y haya sido consumido durante la deficiencia de este nutriente. Una posible explicación es que el amonio se haya acumulado en la vacuola durante la fase exponencial y empleado durante el periodo de estrés pues se sabe que este compuesto está presente en todos los compartimientos de la célula y su concentración varía dependiendo de varios factores, incluyendo su concentración en los compartimientos adyacentes, diferencias significativas de pH y potencial eléctrico entre los compartimientos. Por ejemplo, en los compartimientos donde el amonio no se metaboliza, tales como la vacuola, la concentración de este compuesto puede estar cerca a su valor de equilibrio, mientras que en los compartimientos donde se metaboliza, como el citosol y plastidios, su concentración puede ser menor que el equilibrio previsto [50].

Por otra parte, como una estrategia para asegurar el suministro de P para el mantenimiento de las funciones metabólicas vitales, muchas plantas inferiores lo acumulan en grandes cantidades como polifosfatos, lo que les permite varios ciclos de división celular en ausencia de este nutriente [81, 107]. Este comportamiento ya se ha reportado en la

microalga *Monodus subterraneus*, en un estudio realizado por Khozin-Goldberg y Cohen [10]. Estos autores observaron que el número de células se duplicó después de cuatro días de cultivo bajo limitación de P, de 2.50×10^7 a 4.65×10^7 células·mL⁻¹, lo que indica que el fosfato intracelular fue suficiente para la división celular. Posiblemente la microalga *S. obliquus* (SCO1) haya almacenado P durante la fase exponencial y lo haya empleado durante la fase de limitación de este nutriente.

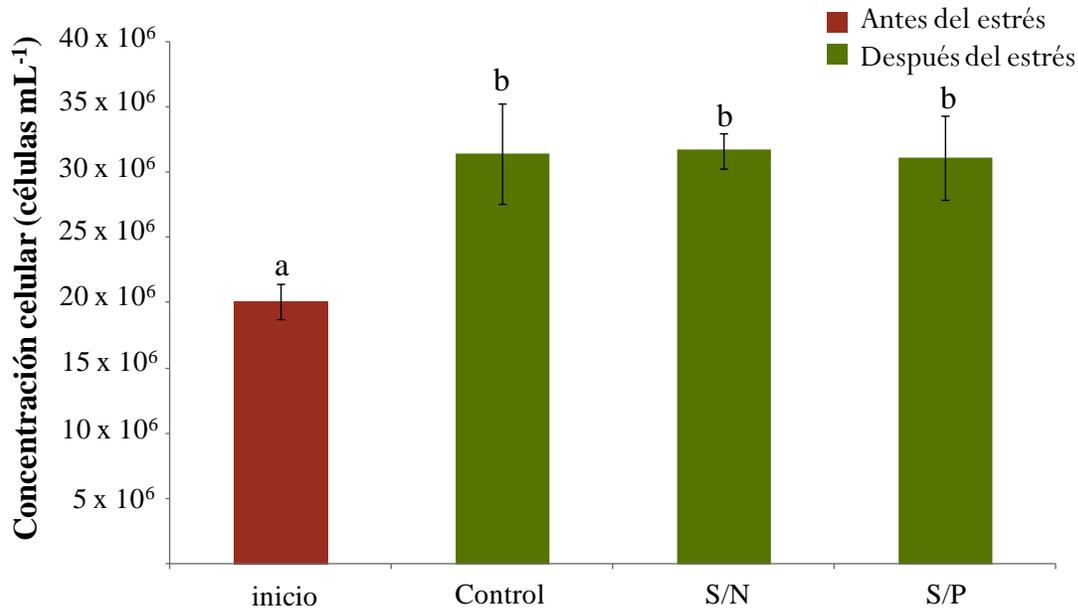


Figura 3.6 Concentración celular en cultivos de *Scenedesmus obliquus* después de la limitación de N y P. inicio: concentración celular antes del estrés; control: experimento sin limitación de nutrientes. S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento con limitación de P. a y b: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3).

3.3.5.2 Productividad de biomasa

Los resultados en cuanto a biomasa seca no presentaron diferencias significativas entre los experimentos de limitación de N, P y el control (Figura 3.7). Los resultados fueron 69.5, 67.5 y 69.3 mg totales, respectivamente. También se observó un aumento significativo de la biomasa seca entre el inicio y el fin de los tratamientos de estrés de 37.2 a 68.8 ± 1.1 mg. Este aumento de biomasa seca después de los tratamientos de estrés puede

deberse, en parte, al incremento de la concentración celular observada en el apartado anterior.

En el presente trabajo se obtuvieron 69.5 mg de biomasa seca bajo limitación de N, mientras que en el trabajo de Mandal y Mallick [73] se reportaron 5 mg de biomasa seca (calculada con base a los datos reportados), empleando el medio de cultivo N11. Esto significa que se obtuvo 13.9 veces más biomasa comparado con el trabajo de Mandal y Mallick. De la misma forma, en el presente trabajo se obtuvieron 67.52 mg de biomasa seca bajo limitación de P, comparado con el trabajo de Mandal y Mallick, este resultado fue 7.94 veces mayor. Es posible que esta diferencia se deba a la cepa de microalga evaluada y al medio de cultivo empleado.

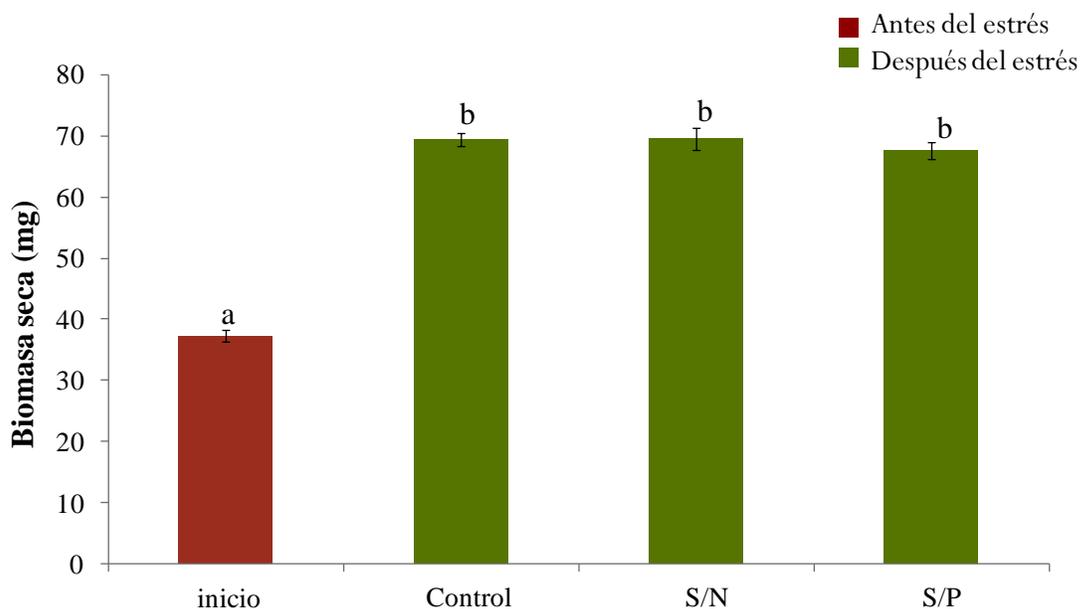


Figura 3.7 Biomasa seca en *Scenedesmus obliquus* después de la limitación de N y P. inicio: biomasa seca antes del estrés; control: experimento con limitación de nutrientes. S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento con limitación de P. a y b: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3)

Los resultados en cuanto a productividad de biomasa no presentaron diferencias significativas entre los experimentos de limitación de N y P y el control (Figura 3.8). Los resultados obtenidos fueron de 231.7, 225.0 y 231.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente. También se observó un aumento significativo de la productividad de la biomasa entre el inicio y el fin del tratamiento de estrés de 125.1 a $229.3 \pm 3.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. La productividad de biomasa en este estudio fue mayor que la obtenida por de Morais y Costa [108], quienes reportaron

una productividad de biomasa de $140 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ con una concentración de 12 % de CO_2 en aire, con *S. obliquus* (LEB 12) y menor comparada con el trabajo de Ho *et al.* [7], quienes reportaron $292.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Esta diferencia puede deberse a que estos autores utilizaron fotobiorreactores para el cultivo de *S. obliquus* (CNW-N).

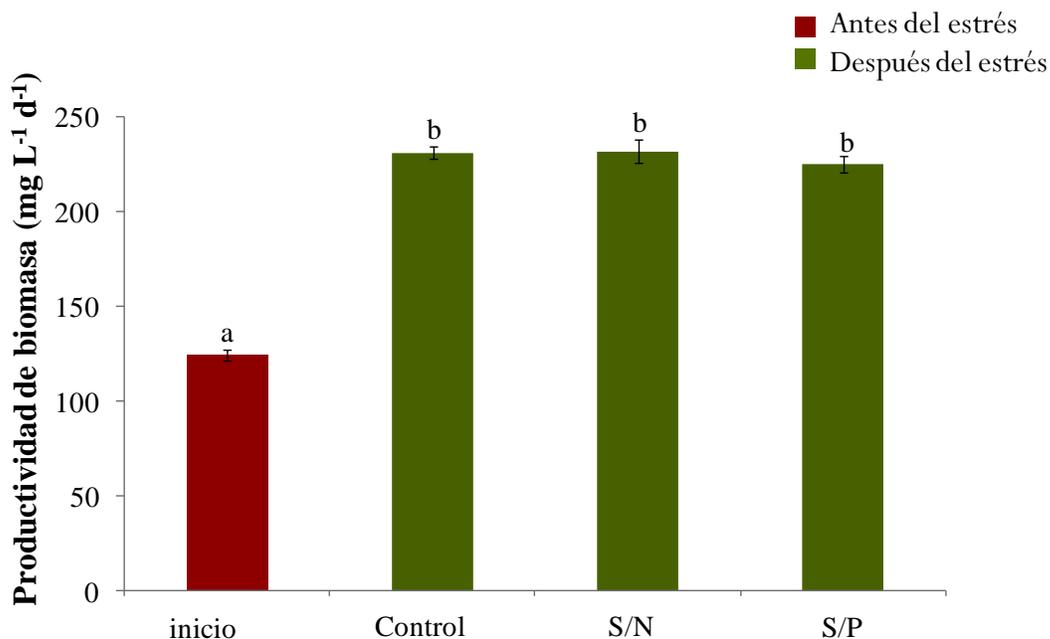


Figura 3.8 Productividad de biomasa seca en *Scenedesmus obliquus* después de la limitación de N y P. inicio: productividad de biomasa antes del estrés; control: experimento sin limitación de nutrientes. S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento con limitación de P. a y b: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3).

3.3.5.3 Contenido y productividad de lípidos

Como se observa en la Figura 3.9, la mayor cantidad de extracto lipídico se obtuvo con el tratamiento de limitación de N (30.3 mg), seguida del tratamiento con limitación de P (26.7 mg).

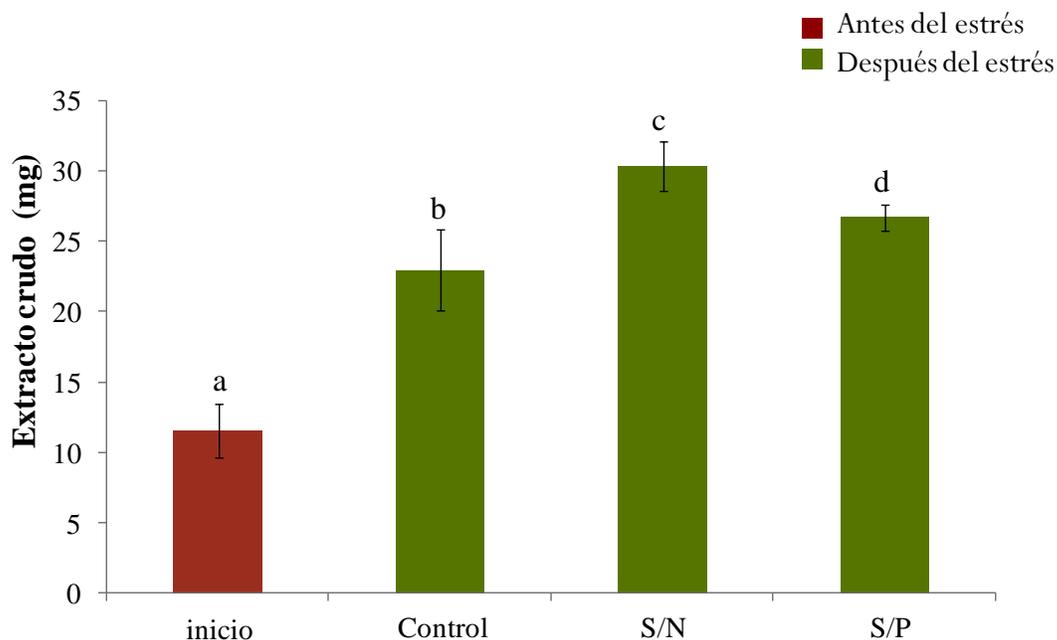


Figura 3.9 Extracto lipídico crudo en *Scenedesmus obliquus* después de la limitación de N y P. inicio: extracto lipídico crudo antes del estrés; control: experimento sin limitación de nutrientes. S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento de limitación de P. a, b, c y d: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3).

Por otra parte, el método convencional utilizado para la determinación del contenido lipídico implica la extracción de los lípidos con solventes y su determinación gravimétrica [109] generalmente reportado como porcentaje lipídico por peso seco de biomasa [6]. Como se muestra en la Figura 3.10, no se observó un aumento significativo del contenido lipídico en el control, (los valores obtenidos fueron 30.9 y 33.7 % de lípidos en base al peso seco de la biomasa, al inicio y final del cultivo, respectivamente). El mayor porcentaje de contenido lipídico se obtuvo con el tratamiento bajo limitación de N (43.6 %). Este resultado es similar al reportado por Mandal y Mallick [73], pues estos autores obtuvieron un contenido lipídico de 43 % de la biomasa seca de cultivos de *S. obliquus* (SAG 276-3a) bajo estrés de N por siete días. También se observa en la Figura 3.10 que el contenido lipídico de los tratamientos bajo limitación de P fue 39.5 %, lo cual representa un valor alto comparado con Mandal y Mallick, pues estos autores obtuvieron un contenido lipídico de 29.5 % de la biomasa cultivada bajo limitación de P por tres días.

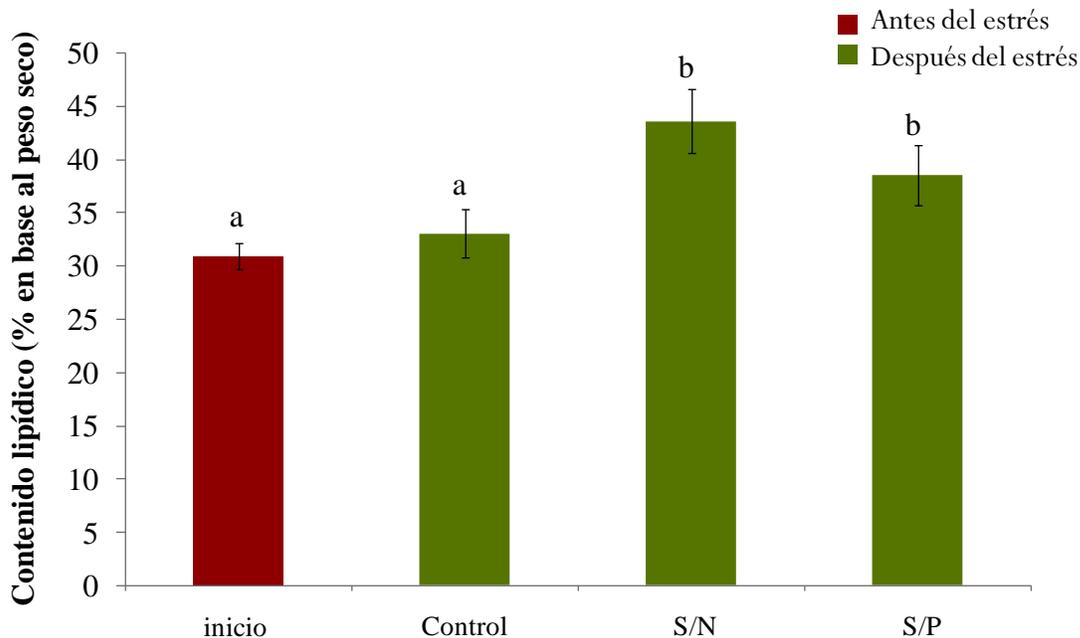


Figura 3.10 Contenido lipídico en *Scenedesmus obliquus* después de la limitación de N y P. inicio: contenido lipídico antes del estrés; control: experimento sin limitación de nutrientes.

S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento con limitación de P. a, b y c: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3).

En la Figura 3.11 se puede observar un aumento significativo de la productividad de lípidos en el control con respecto al inicio de los tratamientos (los valores obtenidos fueron 38.4 y 76.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, al inicio y final del cultivo, respectivamente). Los valores de la productividad lipídica de la biomasa bajo limitación de N, 101.07 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y bajo limitación de P, 86.77 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, son mayores que los reportados en la literatura. Ho et al., [7] obtuvieron 78.73 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ en *S. obliquus* (CNW-N) cuando se le aplicó un estrés de limitación de nutrientes consistente en transferir el cultivo a agua desionizada (sin nutrientes); por su parte Mandal y Mallick [73] reportaron una productividad de lípidos de 58.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ en *S. obliquus* (SAG 276-3a) bajo limitación de N. Es posible que la mayor productividad de lípidos alcanzada en *S. obliquus* (SCO1) se deba a que durante los períodos de limitación de N y P se incrementó su concentración celular y por consiguiente la biomasa seca, mientras que en los estudios de Ho [7] y Mandal y Mallick [73], la biomasa seca disminuyó. Cabe señalar que la productividad de lípidos es una variable trascendental para seleccionar especies de microalgas apropiadas para la producción de

biocombustibles, y en la literatura *S. obliquus* se encuentra entre las que presentan una alta productividad de lípidos [6].

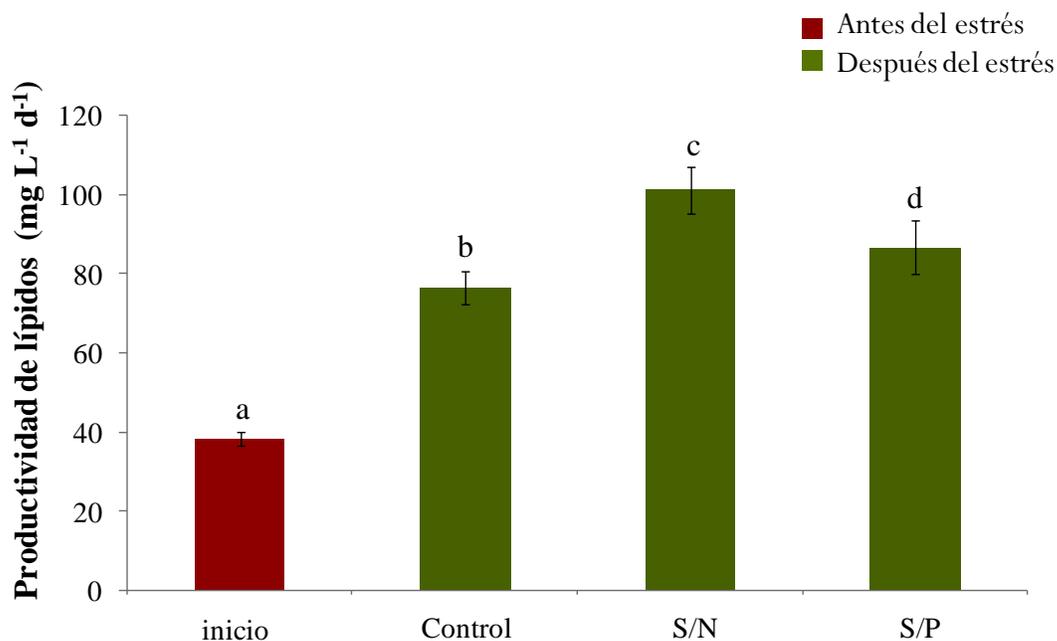


Figura 3.11 Productividad de lípidos en *Scenedesmus obliquus* después de la limitación de N y P. inicio: contenido lipídico antes del estrés; control: experimento sin limitación de nutrientes. S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento con limitación de P. a, b, c y d: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3).

3.3.5.4 Acumulación de lípidos en la célula

Con los valores del extracto lipídico y los valores de la concentración celular se calculó la cantidad de extracto lipídico por célula por tratamiento (Tabla 3.1). Los resultados indican que la microalga incrementa su cantidad de lípidos después de los tratamientos comparados con el control, siendo la limitación de N la que induce un mayor contenido (2.4 veces) de lípidos en la célula.

Tabla 3.1 Acumulación de lípidos por célula en *Scenedesmus obliquus*.

| | Extracto lipídico total (mg) | Número de células (células×10 ⁸) | Extracto por célula (pg · célula ⁻¹) | Acumulación de lípidos por célula (pg · célula ⁻¹) |
|---------|------------------------------|--|--|--|
| Inicio | 11.52 | 10.05 | 1.14 | - |
| Control | 22.93 | 15.71 | 1.45 | 0.31 |
| S/N | 30.32 | 15.83 | 1.91 | 0.77 |
| S/P | 26.03 | 15.56 | 1.67 | 0.53 |

Inicio: valores obtenidos antes del estrés; Control: sin limitación de nutrientes. S/N: extracto por célula con limitación de N; S/P: extracto por célula con limitación de P.

3.3.6 Cambios de morfología y organización celular en *S. obliquus*

Trainor [110], ha reportado que *S. obliquus* presenta variabilidad morfológica, y observó que la división celular es favorecida por la presencia de una fuente de carbono orgánico. Además, la formación de colonias no es constante, puesto que se pueden observar colonias de cuatro células, o bien, crecimiento unicelular. Estos fenómenos dependen del medio de cultivo empleado.

En el presente trabajo se observó que la microalga formaba agrupaciones en colonias de cuatro células en el precultivo (BB), que carece de una fuente de carbono orgánico. Por otro lado, se observó que el cultivo de esta microalga en medio TAP favorece otra forma de organización y distinta morfología celular. Para corroborar que el medio de cultivo afecta la organización y morfología de la microalga, se realizó el siguiente experimento: se inoculó medio líquido, TAP y BB, con una colonia proveniente de medio BB semisólido, y se cultivó por seis días, posteriormente se realizó una resiembra en medio semisólido TAP y BB, respectivamente. Finalmente, de cada cultivo en medio semisólido se tomó una colonia para inocular tanto medio BB como TAP en líquido (Figura 3.12). Los resultados presentados en la figura 3.12 muestran que independientemente del medio semisólido que se utilice para su cultivo, las microalgas crecieron en colonias de cuatro células en el medio BB y en forma unicelular en medio TAP líquido.

Al igual que Trainor [110], en el presente estudio se observó variabilidad morfológica en la microalga en cuestión, cuando es cultivada en los medios BB y TAP. Es posible que la fuente de carbono orgánico (ácido acético) en el medio TAP, haya influido en la organización unicelular de *S. obliquus*. Esta hipótesis surge a raíz de que en el trabajo realizado por Trainor [110], la adición de extracto de levadura al medio Bristol indujo el crecimiento unicelular entre 96-99 % del total de células.

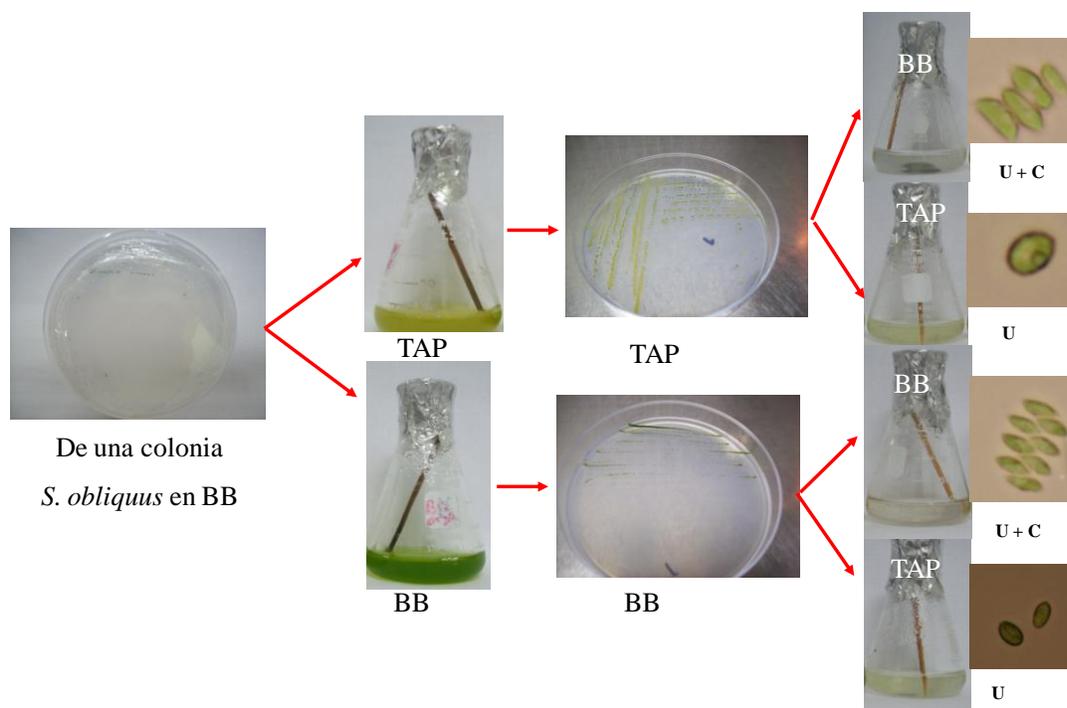


Figura 3.12 Cambios de morfología y organización celular en *Scenedesmus obliquus*. U: organización unicelular. C: organización en colonias de cuatro u ocho células.

3.3.7 Identificación de los ácidos grasos

Los ácidos grasos de *S. obliquus* se identificaron por cromatografía de gases, transesterificando los triacilglicéridos para formar los ésteres metílicos de ácidos grasos correspondientes. Los ésteres de alquilo de ácidos grasos identificados fueron: éster metílico del ácido palmítico (C16:0), éster etílico del ácido palmítico (C16:0), éster metílico del ácido palmitoleico (C16:1), éster metílico del ácido esteárico (C18:0), éster metílico del ácido oleico (C18:1) y éster metílico del ácido linoleico (C18:2), lo cual

coincide con lo reportado por Ho *et al.* [7] en *S. obliquus* (CNW-N), quienes encontraron que los lípidos están compuestos principalmente por ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono.

Conclusiones

Con base en la prueba realizada de selección de medio de cultivo con ácido acético en *S. obliquus*, se concluye que el mejor medio para la acumulación de biomasa es el TAP, ya que se obtuvo una concentración de 25.5×10^6 células·mL⁻¹, la cual fue mayor a las obtenidas en los otros medio de cultivo evaluados.

La evaluación del crecimiento de esta microalga en el medio TAP permitió determinar que el estrés se debe aplicar después de seis días de cultivo en medio completo, pues en este tiempo la microalga inicia su fase estacionaria y que debe durar seis días pues es el tiempo de duración de la misma fase.

La mayor productividad de lípidos se obtuvo con el tratamiento de estrés por limitación de N, 101.07 mg·L⁻¹·d⁻¹, seguida del tratamiento de estrés por limitación de P, 86.77 mg·L⁻¹·d⁻¹. Estos valores sugieren que la cepa es apropiada para la producción de biocombustibles como el biodiesel, ya que son más altos que el promedio reportado en la literatura de 40 mg·L⁻¹·d⁻¹.

Además, se determinó que la limitación de N y P induce la acumulación de lípidos, puesto que la cantidad calculada de éstos por célula fue mayor que en el control.

Los lípidos de la microalga *S. obliquus* están compuestos por ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono, por lo que presenta un perfil apropiado para la producción de biodiesel.

Adicionalmente, los experimentos de multiplicación en medio BB (sin fuente de carbono orgánico) y TAP (con fuente de carbono orgánico) demostraron que la cepa SCO1 de *S. obliquus* puede adquirir diferente morfología y organización celular dependiendo del medio de cultivo en que se encuentre.

Capítulo 4.

Efecto de la limitación de N y P en la producción de lípidos en *Scenedesmus* sp.

4.1 Introducción

La mayor parte de la literatura disponible acerca de la producción de biocombustibles a partir de microalgas se basa en especies identificadas disponibles en colecciones de cultivos. Sin embargo, es muy importante continuar con la bioprospección de otras especies de microalgas pertenecientes a regiones locales con características adecuadas para este fin como: producción de biomasa, productividad de lípidos y perfil de ácidos grasos. La idea de la bioprospección de los hábitats locales del Estado de Yucatán como: cenotes, aguadas temporales, sartenejas (“haltunes”), canteras de material calizo (“sascaberas”) abandonadas o en explotación, y pozos de extracción de agua, es trascendental para encontrar microalgas para su utilización en la producción de biocombustibles o de compuestos de alto valor comercial. Por ejemplo, el laboratorio Nacional de Energía Renovable de Estados Unidos (NREL, por sus siglas en Inglés), puso en marcha el Programa de Especies Acuáticas (ASP, por sus siglas en Inglés) en 1978 y recolectó más de 3000 cepas de microalgas del oeste, noroeste, sureste y las regiones del territorio continental de EE.UU., así como Hawaii, de forma sistemática para encontrar cepas con alto contenido de lípidos [95]. Este ejemplo deja claro que el paso fundamental para llevar con éxito la bioprospección, es recolectar e identificar cepas con alta productividad o contenido de lípidos. Por lo tanto, el aislamiento de cepas adaptadas a las condiciones climáticas locales es de fundamental importancia para el éxito de todo cultivo masivo de microalgas incluyendo la producción de biocombustibles. El campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) posee una colección de microalgas provenientes de diversas áreas de la región del Estado (Colección de microalgas de agua dulce del Herbario Alfredo Barrera Marín), sin embargo, sólo una de ellas, *Chlorella saccharophila*, ha sido estudiada como fuente de lípidos para biodiesel [92]. En este trabajo se estudió la cepa *Scenedesmus* sp. aislada del Parque Ecológico del Poniente, en Mérida, Yucatán. El interés en estudiar a esta microalga se debe a que está adaptada a las condiciones de la región. Esta cepa no ha sido estudiada y por lo tanto, este

trabajo brindará nueva información sobre su potencial para la producción de biocombustibles a partir los lípidos que sintetiza.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Medios de cultivo

El cultivo de *Scenedesmus* sp. para acumulación de biomasa no había sido establecido en condiciones de laboratorio, por lo que se optó por emplear las mismas condiciones de cultivo empleadas para *S. obliquus* (SCO1). Se evaluaron los cinco medios de cultivo descritos en el capítulo anterior: Bold's Basal (BB), Bold's Basal sin NaCl (BB s/s), Fitzgerald (FTZ), BG11 y Tris-Acetato-Fosfato (TAP), todos con y sin ácido acético como fuente de carbono. La determinación del medio de cultivo más adecuado para la producción de biomasa se realizó en matraces de 50 mL con 10 mL de cada medio de cultivo, con un inóculo inicial de 10,000 células·mL⁻¹. Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo en matraces de 250 mL con 50 mL del medio seleccionado y se tomaron muestras cada 24 horas. Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

4.2.2 *Scenedesmus* sp.

Scenedesmus sp. fue proporcionada amablemente por la Q.F.B. Silvia López Adrián, de la Colección de microalgas de agua dulce del Herbario “Alfredo Barrera Marín” (Universidad Autónoma de Yucatán). Esta microalga fue aislada del Parque Ecológico del Poniente, en Mérida, Yucatán.

4.2.3 Experimentos de limitación de N y P

Para evaluar el efecto de la escasez de nitrógeno en la producción de lípidos en *Scenedesmus* sp, primero se recuperó la biomasa del medio de cultivo (medio TAP con todos los nutrientes) por centrifugación. Posteriormente, se resuspendió en el medio TAP con limitación de N (este medio se preparó eliminando NH₄Cl del medio TAP, Anexo I), cabe señalar que la solución stock de metales traza de Hutner contiene (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, que también es una fuente de nitrógeno, quedando la concentración de este nutriente en 0.011 mg·L⁻¹ en el medio de cultivo. Luego, se incubó la microalga por cinco días, a una temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo 16:8 (luz:oscuridad) en un agitador

orbital a 140 rpm. Como control se utilizó un cultivo en medio TAP completo (concentración normal de N). Para los experimentos de limitación de P, se repitió el mismo proceso, pero a diferencia del anterior, el K_2HPO_4 y KH_2PO_4 del medio TAP fueron reemplazados por una concentración equimolar de KCl. Los experimentos se realizaron con tres matraces por experimento.

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Descontaminación de la cepa

Inicialmente, se recibió una alícuota del cultivo de *Scenedesmus* sp. en medio Bold's Basal (BB) líquido. Esta se resembró en el mismo medio en estado semisólido y se observó la presencia de contaminación bacteriana, por lo que se procedió a descontaminarla por el método de aislamiento por dilución descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. Como se observa en la Tabla 4.1, la cuarta dilución dio como resultado el desarrollo de una colonia sin contaminación bacteriana que permitió su multiplicación como un cultivo puro (Figura 4.1).

Tabla 4.1 Resultados obtenidos del aislamiento por dilución.

| Dilución | Crecimiento algal | Contaminación bacteriana |
|----------|-------------------|--------------------------|
| 1:10 | Alto | Alta |
| 1:100 | Medio | Media |
| 1:1000 | Bajo | Baja |
| 1:10000 | Una colonia | Ninguna |
| 1:100000 | Ninguno | Ninguna |



Figura 4.1. Cultivo axénico de *Scenedesmus* sp.

4.3.2 Evaluación de los diferentes medios con ácido acético como fuente de carbono orgánico

Se evaluaron los diferentes medios con ácido acético como fuente de carbono. En la Figura 4.2 se puede observar que a partir del cuarto día inició la fase exponencial en el medio TAP, a partir del sexto día la microalga comenzó a multiplicarse con menor velocidad hasta el día 14. En este medio de cultivo se logró la mayor concentración celular con 23.2×10^6 células·mL⁻¹ a los 14 días de cultivo. El medio de cultivo FTZ es el segundo con mayor concentración celular (3.2×10^6 células·mL⁻¹) a los seis días, pero con aproximadamente una séptima parte de lo obtenido con el TAP. Le siguen los medios de cultivo BB y BB s/s, los cuales alcanzaron concentraciones de 2.7×10^6 y 2.6×10^6 células·mL⁻¹, respectivamente, ambos a los ocho días de cultivo. Finalmente, el medio de cultivo con menor concentración celular fue el BG11 con 2.4×10^6 células·mL⁻¹ a los 10 días de cultivo.

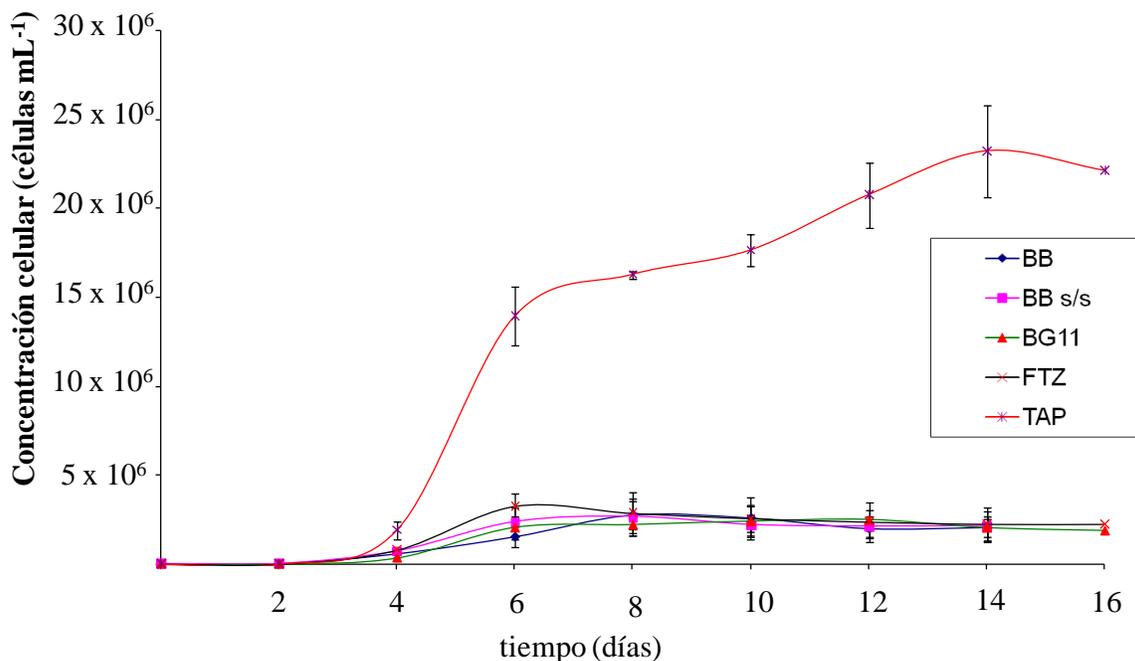


Figura 4.2 Evaluación del efecto de los diferentes medios de cultivo con ácido acético como fuente de carbono en *Scenedesmus* sp. Medios evaluados: BB, medio Bold's Basal. BBs/s, medio Bold's Basal sin NaCl. TAP, medio Tris-Acetato-Fosfato. FTZ, medio Fitzgerald. BG11, medio BG11

En todos los medios de cultivo se observó la formación de aplanosporas después de los seis días. Las aplanosporas tienen forma ovalada y están compuestas de pequeñas células envueltas por una membrana (Figura 4.3 b). En un estudio realizado por Davis [111], se observó la formación de aplanosporas en cultivos viejos de *Scenedesmus quadricauda*, las cuales estaban llenas de aceite y almidón. Esta es una forma característica que adquieren algunas especies de microalgas cuando se encuentran bajo condiciones de estrés, tales como el agotamiento de nutrientes o por una alta intensidad de luz [112].

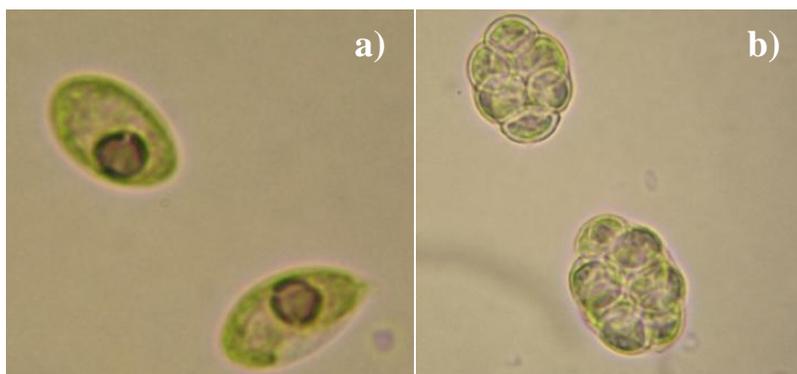


Figura 4.3 Células de *Scenedesmus* sp. a) A los cuatro días de cultivo, b) Formación de aplanosporas a los ocho días de cultivo.

4.3.3 Evaluación de los diferentes medios sin fuente de carbono orgánico

Se evaluaron los cinco diferentes medios, pero sin fuente de carbono orgánico, con el fin de determinar la ausencia de este nutriente sobre la concentración celular. Los resultados muestran que el cultivo de *Scenedesmus* sp. en medio TAP alcanza una concentración celular de 14.94×10^6 células·mL⁻¹ a los 16 días de cultivo (Figura 4.4). También se observa que los medios de cultivo con mayor concentración seguidos del TAP son el BB s/s y FTZ con 4.5×10^6 y 4.0×10^6 células·mL⁻¹, respectivamente, a los 14 días de cultivo. Los medios de cultivo BG11 y BB alcanzaron concentraciones de 3.8×10^6 y 3.6×10^6 células·mL⁻¹, respectivamente.

Los resultados indican que la adición de ácido acético incrementa la concentración celular y disminuye el tiempo de cultivo. Probablemente la adición de este compuesto aumenta la respiración celular, como se ha reportado en *C. reinhardtii* [113] y con ello la

división celular, pues la tasa de respiración de cualquier sustrato está íntimamente relacionada con el crecimiento y división celular [50].

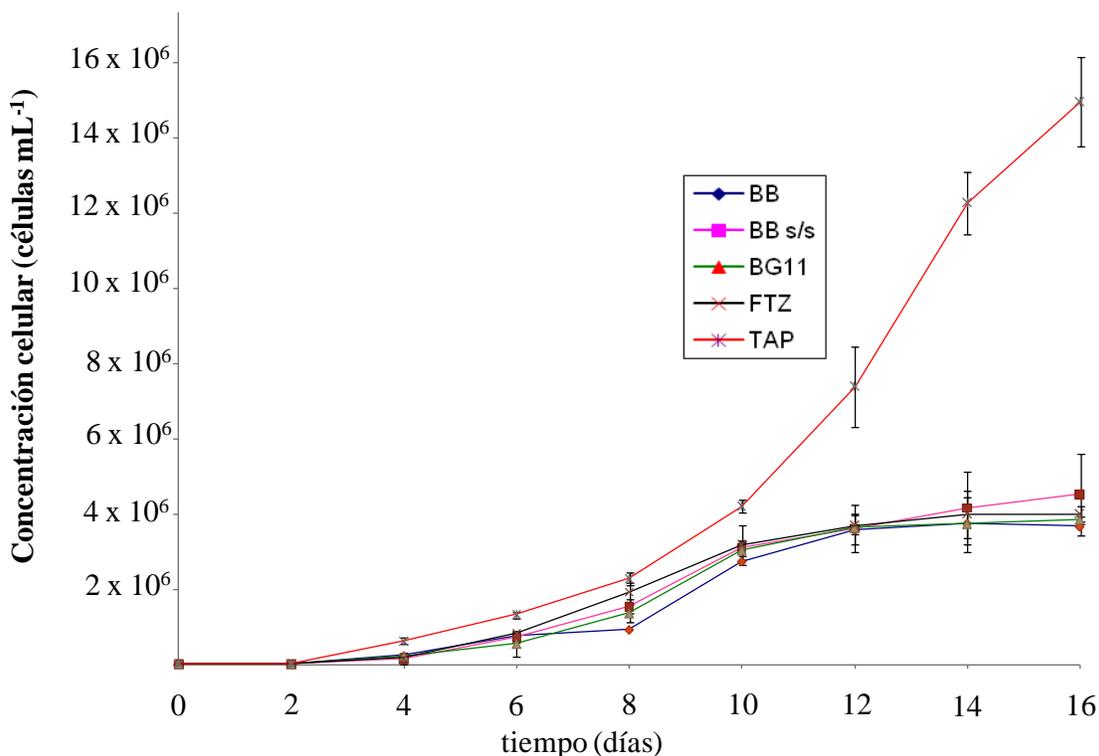


Figura 4.4 Evaluación del efecto de los diferentes medios de cultivo sin fuente de carbono orgánico en *Scenedesmus* sp. Medios evaluados: BB, medio Bold's Basal. BBs/s, medio Bold's Basal sin NaCl. TAP, medio Tris-Acetato-Fosfato. FTZ, medio Fitzgerald. BG11, medio BG11

4.3.4 Determinación del tiempo para la aplicación del estrés

La evaluación de los diferentes medios de cultivo mostró que el mejor medio para acumular biomasa es el TAP. Por tanto la curva de crecimiento, se realizó en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo. Los resultados muestran que a partir del segundo día comenzó la fase exponencial (Figura 4.5). A los cinco días se inició una desaceleración de la velocidad de multiplicación celular, por lo que se tomó este tiempo para iniciar los experimentos de limitación de N y P. Por otro lado, se estableció un tiempo de cinco días para incubar las microalgas bajo estrés, pues no se observó una fase estacionaria como tal, por lo que se eligió el mismo tiempo en el que se alcanza el final de la fase exponencial.

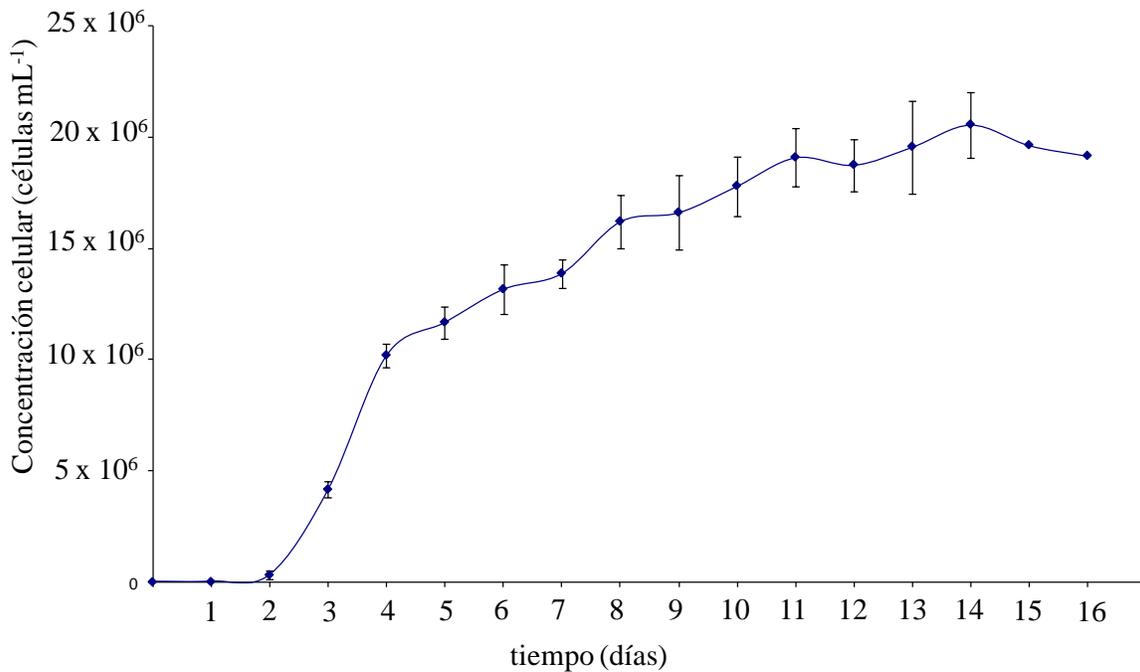


Figura 4.5 Curva de crecimiento de *Scenedesmus* sp. en medio TAP.

4.3.5 Efecto de la limitación de N y P

4.3.5.1 Concentración celular

Los resultados obtenidos muestran que después de cinco días de estrés, los experimentos de limitación de N, P y el control (medio completo) no presentaron una diferencia significativa en la concentración celular (Figura 4.6). Los valores fueron 15.0×10^6 , 13.9×10^6 y 15.8×10^6 células·mL⁻¹, respectivamente, lo que sugiere que el estrés aplicado no influyó en la división celular. También se observó un aumento significativo de la concentración celular entre el inicio y el fin del tratamiento de estrés de 10.8×10^6 a 14.9×10^6 células·mL⁻¹. Estos valores son similares a los obtenidos en la curva de crecimiento (Figura 4.5) a los cinco y diez días de cultivo (que corresponden al inicio y fin de los tratamientos de estrés).

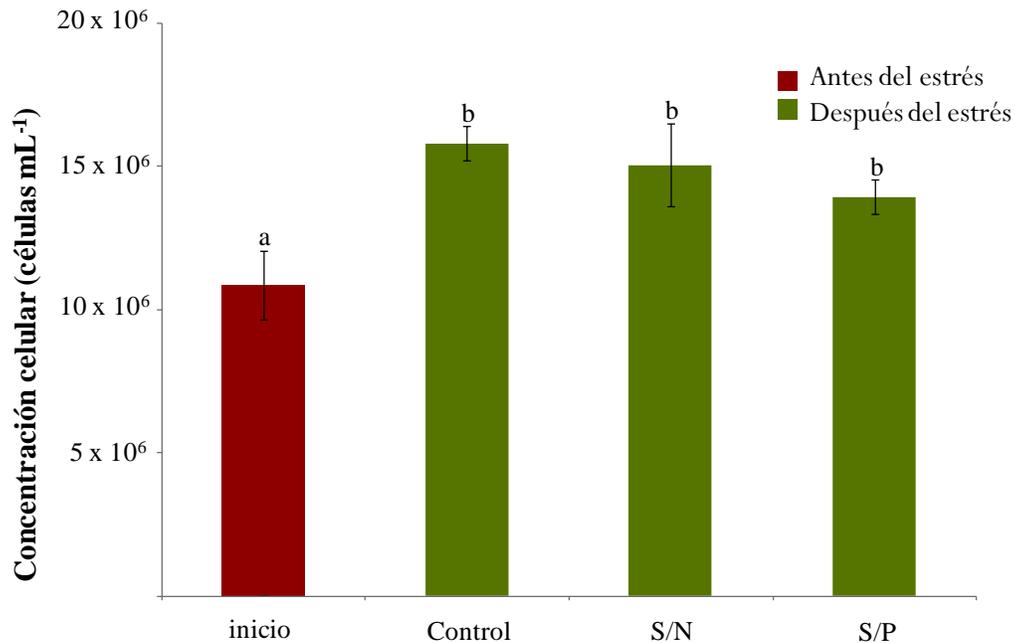


Figura 4.6 Concentración celular en *Scenedesmus* sp. después de la limitación de N y P. inicio: concentración celular antes del estrés; control: experimento sin limitación de nutrientes. S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento con limitación de P. a y b: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3).

4.3.5.2 Productividad de biomasa

Los resultados en cuanto a biomasa seca no presentaron diferencias significativas entre los experimentos de limitación de N, P y el control (Figura 4.7). Los resultados fueron 77.9, 80.0 y 86.4 mg, respectivamente. También se observó un aumento significativo de la biomasa seca entre el inicio y el fin del tratamiento de estrés de 37.2 a 80.5 mg. Este aumento de biomasa seca se debe en parte al incremento de la concentración celular. Los valores obtenidos de biomasa seca bajo limitación de N y P son mayores que los reportados en *C. saccarophila* y *C. reinhardtii* bajo limitación de N [92].

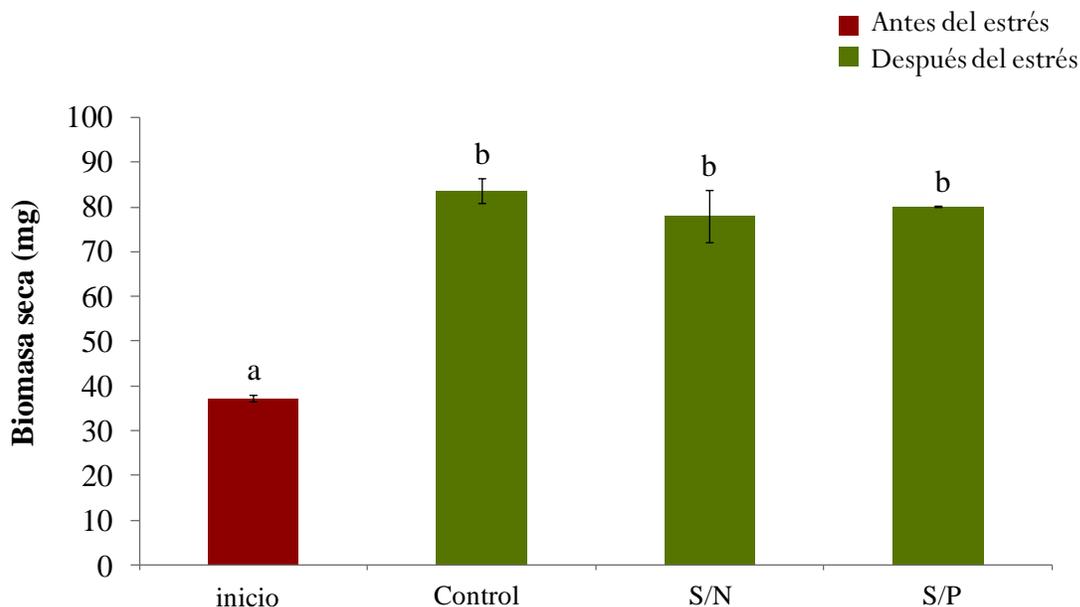


Figura 4.7 Biomasa seca en *Scenedesmus* sp. después de la limitación de N y P. inicio: biomasa seca antes del estrés; control: experimento sin limitación de nutrientes. S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento con limitación de P; a y b: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3)

Los resultados en cuanto a productividad de biomasa no presentaron diferencias significativas entre los experimentos de limitación de N y P y el control (Figura 4.8). Los resultados obtenidos fueron de 311.6, 320.2 y 334.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente. También se observó un aumento significativo de la productividad de la biomasa entre el inicio y el fin del tratamiento de estrés de 148.9 a 322.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. La cepa de *Scenedesmus* sp. evaluada en el presente estudio presenta una alta productividad en comparación con de Morais y Costa [108], quienes reportaron una productividad de biomasa de 140 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ con una concentración de 12 % de CO_2 en aire, con *S. obliquus* (LEB 12). La productividad de biomasa en este trabajo es similar a lo encontrado por Ho *et al.* [7] quienes reportan una productividad de 292.5 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ utilizando fotobiorreactores en el cultivo de *S. obliquus* (CNW-N). Sin embargo, valores de productividad más altos fueron reportados por Sánchez *et al.* [114] quienes reportan 550 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Estos autores evaluaron las condiciones de crecimiento adecuadas (medio de cultivo, irradiación, temperatura, pH y salinidad) para lograr una productividad máxima de biomasa y contenido de luteína en la biomasa. Lo anterior podría significar que existe la oportunidad de mejorar la productividad de biomasa en el cultivo de la cepa de *Scenedesmus* sp. evaluada en el presente estudio.

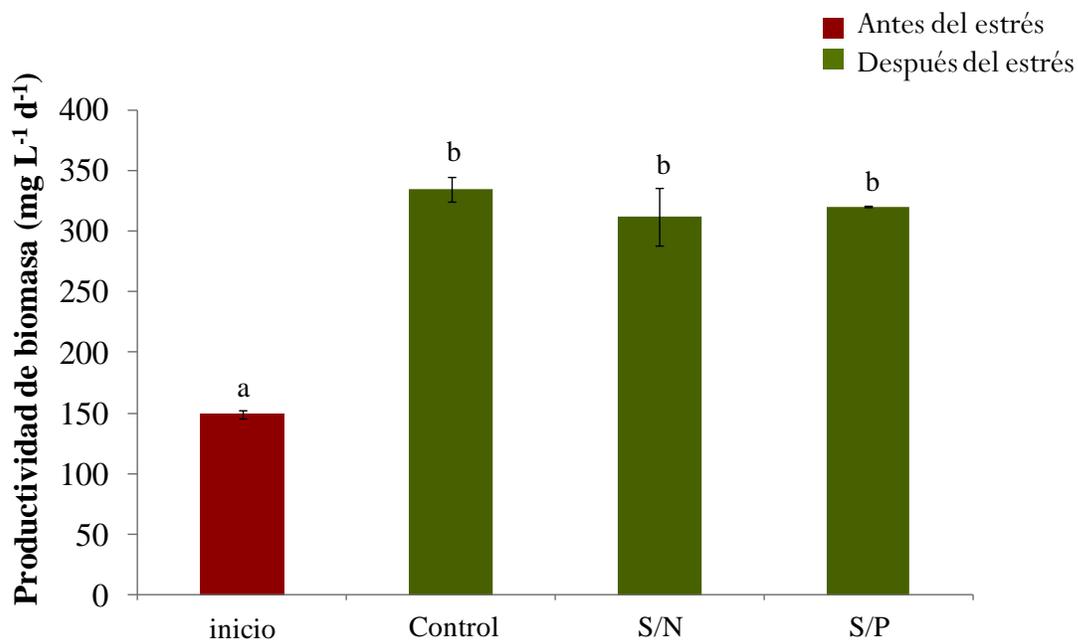


Figura 4.8 Productividad de biomasa seca en *Scenedesmus* sp. después de la limitación de N y P. inicio: productividad de biomasa antes del estrés; control: experimento sin limitación de nutrientes. S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento con limitación de P; a y b: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3)

4.3.5.3 Contenido y productividad de lípidos

Como se observa en la Figura 4.9, se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos de estrés (33.3 mg bajo limitación de N y 33.5 mg bajo limitación de P) y el control (27.8 mg) en cuanto al peso del extracto lipídico crudo.

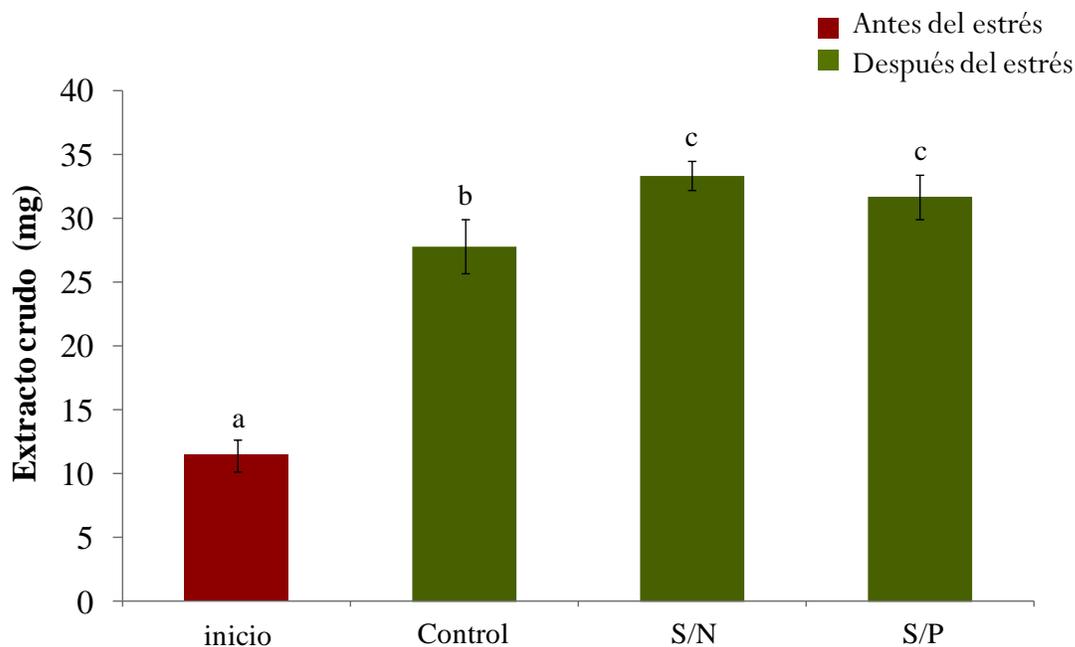


Figura 4.9 Extracto lipídico crudo en *Scenedesmus* sp. después de la limitación de N y P. inicio: extracto lipídico crudo antes del estrés; control: experimento sin limitación de nutrientes. S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento con limitación de P; a, b y c: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3)

La búsqueda de especies de microalgas oleaginosas requiere una frecuente medición del contenido de lípidos, un parámetro fundamental para la selección de microalgas para la producción de biocombustibles.

Como se muestra en la Figura 4.10, no se observó un aumento significativo del contenido lipídico en el control con respecto al inicio de los tratamientos (los valores obtenidos fueron 30.7 y 33.2 % de lípidos en base al peso seco de la biomasa, al inicio y final del cultivo, respectivamente). Después de la limitación de N se obtuvo un 42.97 % de lípidos en base al peso seco, valor similar al reportado por Mandal y Mallick en *S. obliquus* [73]. También se observa en la Figura 4.10 que el contenido lipídico del tratamiento bajo limitación de P fue de 39.4 %, el cual es mayor comparado con Mandal y Mallick, pues estos autores obtuvieron un contenido lipídico de 29.5 % de la biomasa cultivada bajo limitación de P por tres días. Ambos tratamientos de limitación de N y P fueron mayores comparados con el control.

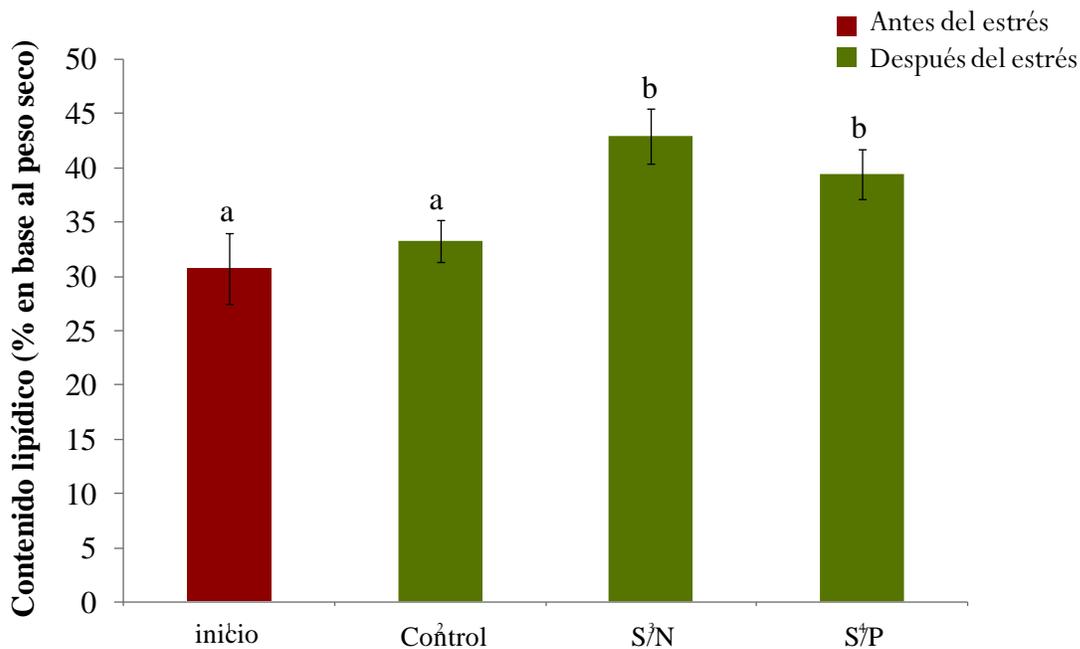


Figura 4.10 Contenido lipídico en *Scenedesmus* sp. después de la limitación de N y P. inicio: contenido lipídico antes del estrés; control: experimento sin limitación de nutrientes. S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento con limitación de P. a y b: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3)

Como se observa en la Figura 4.11 se puede observar un aumento significativo de la productividad de lípidos en el control con respecto al inicio de los tratamientos (los valores obtenidos fueron 45.7 y 111.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, al inicio y final del cultivo, respectivamente). También se observó un aumento cuando se aplicaron las limitaciones de N, 133.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ y P, 126.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ con respecto al control. Estos valores son mayores que los reportados en la literatura, Ho *et al.* [7] obtuvieron 78.73 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ en *S. obliquus* (CNW-N) cuando la cultivaron en agua desionizada (sin nutrientes) y Mandal y Mallick [73] reportaron una productividad de lípidos de 58.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ en *S. obliquus* (SAG 276-3a) bajo limitación de N.

Gong y Jiang [109] sugieren que para que una microalga sea considerada como una fuente potencial para la producción de biocombustibles debe presentar un contenido lipídico de al menos 20 % con base al peso seco y una productividad de lípidos de 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, por lo tanto *Scenedesmus* sp puede ser considerada como una buena candidata para la producción de biocombustibles ya que incluso los valores mínimos obtenidos en este

trabajo en cuanto al contenido y productividad de lípidos (39.43 %, y 126.31 mg·L⁻¹·d⁻¹, respectivamente) son mayores que los mencionados en la literatura

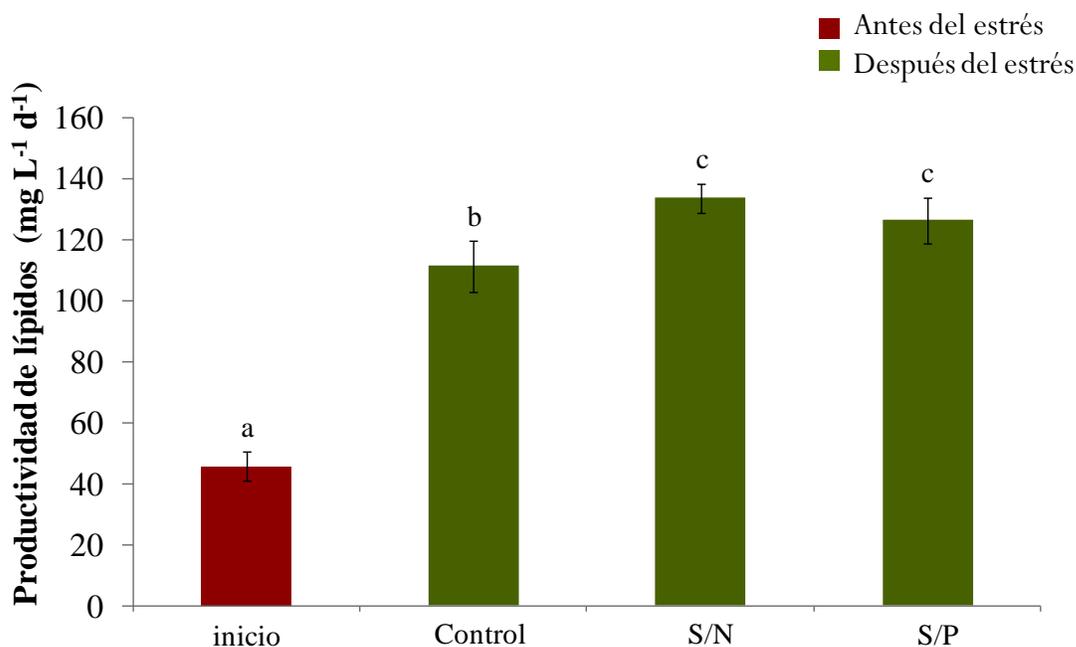


Figura 4.11 Productividad de lípidos en *Scenedesmus* sp. después de la limitación de N y P. inicio: contenido lipídico antes del estrés; control: experimento sin limitación de nutrientes.

S/N: experimento con limitación de N; S/P: experimento con limitación de P; a, b y c: representan diferencias significativas (ANOVA, nivel de confianza 95%, n=3)

4.3.5.4 Acumulación de lípidos en la célula

Con los valores obtenidos del extracto lipídico y de la concentración celular se calculó la cantidad de extracto por célula por tratamiento (Tabla 4.2). Los resultados indican que la microalga incrementa su cantidad de lípidos 1.7 veces después del tratamiento con limitación de N. Es posible que el aumento de lípidos sea producido por la síntesis *de novo* de los mismos, ya que son características que poseen algunas microalgas oleaginosas como forma de almacenamiento de energía [69].

Tabla 4.2 Acumulación de lípidos por célula en *Scenedesmus* sp.

| | Extracto lipídico total (mg) | Número de células (células×10 ⁸) | Extracto por célula (pg · célula ⁻¹) | Acumulación de lípidos por célula (pg · célula ⁻¹) |
|---------|---------------------------------|--|--|---|
| Inicio | 11.44 | 5.43 | 2.10 | - |
| Control | 27.88 | 7.90 | 3.51 | 1.41 |
| S/N | 33.38 | 7.53 | 4.52 | 2.42 |
| S/P | 31.57 | 6.97 | 4.43 | 2.33 |

Inicio: valores obtenidos antes del estrés; Control: sin limitación de nutrientes. S/N: extracto por célula con limitación de N; S/P: extracto por célula con limitación de P.

4.3.6 Identificación de los ácidos grasos

Los ácidos grasos de *Scenedesmus* sp. se identificaron por cromatografía de gases, transesterificando los triacilglicéridos para formar los ésteres metílicos de ácidos grasos correspondientes.

Los ésteres de alquilo de ácidos grasos identificados fueron: éster metílico del ácido palmítico (C16:0), éster metílico del ácido palmitoleico (C16:1), éster metílico del ácido esteárico (C18:0), éster metílico del ácido oleico (C18:1) y éster metílico del ácido linoleico (C18:2), lo cual coincide con lo reportado en otras microalgas del mismo género. Ho *et al.* [7] encontraron que los lípidos en *S. obliquus* (CNW-N) están compuestos principalmente por ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono. Yoo *et al.* observaron que los lípidos de *Scenedesmus* sp. (KCTC AG20831) están compuestos por los ácidos grasos C16:0, C18:1 y C18:2.

Conclusiones

Con base en la prueba realizada de selección de medio de cultivo con ácido acético en *Scenedesmus* sp., se concluyó que el mejor medio para la acumulación de biomasa fue el TAP, ya que se obtuvo una concentración de 23.2×10^6 células·mL⁻¹, la cual es mayor a las obtenidas en los otros medios de cultivo evaluados.

La realización de la curva de crecimiento en medio TAP mostró que el tiempo para iniciar la limitación de N y P es de cinco días (inicio de la fase estacionaria), y que el tiempo de aplicación del estrés recomendable es de cinco días (duración de la fase estacionaria).

Se pudo comprobar que la limitación de N ocasionó un aumento de 1.7 veces la acumulación lipídica por célula en *Scenedesmus* sp.

Los ésteres metílicos encontrados en *Scenedesmus* sp. son los apropiados para la producción de biodiesel [115]. No se encontraron ésteres etílicos como en el caso de *S. obliquus*.

Se sugiere que *Scenedesmus* sp. puede ser considerada como una buena candidata para la obtención de lípidos para la producción de biocombustibles.

Conclusiones Generales y Perspectivas

La productividad de biomasa y lípidos son considerados como parámetros claves en la producción de biocombustibles en microalgas. Estos parámetros fueron evaluados en las microalgas *S. obliquus* y *Scenedesmus* sp. bajo limitación de N y P, encontrando en general valores superiores a los establecidos en la literatura, por lo que se sugiere que pueden considerarse como candidatas para la producción de biocombustibles.

La limitación de N y P en ambas microalgas tuvieron como efecto el incremento de la acumulación lipídica por célula. Este fue mayor bajo la limitación de N en *S. obliquus*, mientras que en *Scenedesmus* sp. no se encontró diferencia significativa entre los incrementos producidos por los tratamientos evaluados.

Se recomienda realizar un estudio más detallado en ambas microalgas en cuanto a la cuantificación de los ésteres metílicos que se pueden obtener de estas microalgas.

Finalmente, se concluye que de las dos microalgas evaluadas la que tiene mayor potencial para la producción de biocombustibles es *Scenedesmus* sp., pues mostró mayor productividad de biomasa y lípidos en menor tiempo de cultivo. Además, la selección de especies adaptadas a las condiciones climáticas locales podrían ayudar a obtener altos rendimientos de biomasa y de esta manera reducir costos al momento de realizar su cultivo a nivel industrial.

ANEXO 1

Composición de los medios de cultivos

Tabla A1.1 Composición del medio Bold's Basal [88].

| Reactivos | Solución Stock (g · L ⁻¹) | Cantidad usada | Concentración final (M) |
|--|--|-------------------|----------------------------|
| Macronutrientes | | | |
| NaNO ₃ | 25.0 | 10 mL | 2.94×10^{-3} |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 2.50 | 10 mL | 1.70×10^{-4} |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 7.50 | 10 mL | 3.04×10^{-4} |
| K ₂ HPO ₄ | 7.50 | 10 mL | 4.31×10^{-4} |
| KH ₂ PO ₄ | 17.50 | 10 mL | 1.29×10^{-3} |
| NaCl | 2.50 | 10 mL | 4.28×10^{-4} |
| Solución EDTA alcalina | | 1 mL | |
| EDTA | 50.00 | | 1.71×10^{-4} |
| KOH | 31.00 | | 5.53×10^{-4} |
| Solución de hierro acidificado | | 1 mL | |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 4.98 | | 1.79×10^{-5} |
| H ₂ SO ₄ | | 1 mL | |
| Solución de boro | | 1 mL | |
| BO ₃ H ₃ | 11.42 | | 1.85×10^{-4} |
| Solución de metales traza | | 1 mL | |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8.82 | | 3.07×10^{-5} |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 1.44 | | 7.28×10^{-6} |
| MoO ₇ O ₂ (NH ₄) ₆ ·4H ₂ O | 0.71 | | 4.93×10^{-6} |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 1.57 | | 6.29×10^{-6} |
| COCl ₂ ·6H ₂ O | 0.49 | | 1.68×10^{-6} |

Tabla A1.2 Composición del medio TAP [89].

| Soluciones stock | Para 1 L |
|--------------------------------------|-----------------|
| Tris base 1M | 20 ml |
| Buffer de fosfato II | 1 ml |
| Metales Traza Hutner | 1 ml |
| Solución A | 10 ml |
| Ácido acético glacial (pH de 7.0) | 1 ml |

| Solución A | | Buffer de fosfato II | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| Reactivos | Para 500 ml (H₂O d) | Reactivos | Para 100 mL (H₂O d) |
| NH ₄ Cl | 20 g | K ₂ HPO ₄ | 10.8 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 5 g | KH ₂ PO ₄ | 5.6 g |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 2.5 g | | |

| Metales traza de Hutner | |
|--|------------------------------------|
| Reactivos | Para 1 L(H₂O dd) |
| BO ₃ H ₃ | 11.4 g |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 22.0 g |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 5.06 g |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 4.99 g |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 1.61 g |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 1.57 g |
| Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ ·4H ₂ O | 1.1 g |

Tabla A1.3 Composición del medio Fitzgerald [8].

| 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 |

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

Tabla A1.4 Composición del medio BG11 [88].

| 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 |

| Componente | Para 100mL | Componente | para 100mL |
|--------------------------------------|-------------------|--|-------------------|
| solucion 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 (micronutrientes) | |
| 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 ₂ (NH ₄) ₆ ·4H ₂ O | 1.25g |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0.59 g | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.25 g |

ANEXO 2.

Tabla A2 Formulación de la solución de yoduro de lugol.

| Yoduro de lugol | |
|---|-----|
| Reactivos Para 100 ml (H₂O d) | |
| I | 1 g |
| KI | 2 g |

Bibliografía

1. T. M. Mata; A. A. Martins; N. S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renew. Sus. Energy Rev.* 14, 217-232, 2010
2. E. A. Ehimen; S. Connaughton; Z. Sun, Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass, *GCB Bioenergy* 1, 371-381, 2009
3. R. Sarin; M. Sharma; S. Sinharay, Jatropha–Palm biodiesel blends: An optimum mix for Asia, *Fuel* 86, 1365-1371,
4. Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotech. Adv.* 25, 294-306, 2007
5. Y. Chisti, Biodiesel from microalgae beats bioethanol, *Trends Biotechnol.* 26, 126-131, 2008
6. M. Griffiths; S. Harrison, Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production, *J. Appl. Phycol.* 21, 493-507, 2009
7. S.-H. Ho; W.-M. Chen; J.-S. Chang, *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production, *Bioresour Technol.* 101, 8725-8730, 2010
8. A. Widjaja; C.-C. Chien; Y.-H. Ju, Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*, *J. Taiwan Inst. Chem.E. J* 40, 13-20, 2009
9. Y. Li; M. Horsman; B. Wang, Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*, *Appl. Microbiol. Biot.* 81, 629-636, 2008
10. I. Khozin-Goldberg; Z. Cohen, The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*, *Phytochemistry* 67, 696-701, 2006
11. S. M. Renaud; L.-V. Thinh; G. Lambrinidis, Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures, *Aquaculture* 211, 195-214, 2002
12. M. Takagi; Karseno; T. Yoshida, Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells, *J. Biosci. Bioeng.* 101, 223-226, 2006
13. L. Barsanti; P. Gualtieri, *Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology* CRC Press, New York, 2006, 301
14. K. L. Burdon; A. B. Williams, *Microbiologia*, Publicaciones Cultural, México, 1982,
15. R. Lee, *Phycology*, Cambridge University Press, New York, 2008,
16. M. Prescott; J. Harley; D. Klein, *Microbiología*, Mc Graw Hill, 2004,
17. J. Wehr; R. Sheath, *Freshwater algae of North America: ecology and classification*, Academic Press, San Diego, California, 2003, 918
18. E. W. Becker, Biotechnology and exploitation of the green alga *Scenedesmus obliquus* in India, *Biomass* 4, 1-19, 1984
19. Y. Li; M. Horsman; N. Wu, Biofuels from Microalgae, *Biotechnol. Progr.* 24, 815-820, 2008
20. A. Singh; P. S. Nigam; J. D. Murphy, Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels, *Bioresour. Technol.* 102, 10-16, 2011

21. J. K. Pittman; A. P. Dean; O. Osundeko, The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources, *Bioresour. Technology* 102, 17-25, 2011
22. S. Sawayama; S. Inoue; Y. Dote, CO₂ fixation and oil production through microalga, *Energy Convers. Manag.* 36, 729-731, 1995
23. M. E. Martínez; S. Sánchez; J. M. Jiménez, Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*, *Bioresour. Technol.* 73, 263-272, 2000
24. S. Aslan; I. K. Kapdan, Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae, *Ecol. Eng.* 28, 64-70, 2006
25. B. Wang; Y. Li; N. Wu, CO₂ bio-mitigation using microalgae, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 707-718, 2008
26. A. Kumar; S. Ergas; X. Yuan, Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions, *Trends Biotechnol.* 28, 371-380, 2010
27. M. G. de Morais; J. A. V. Costa, Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide, *Energy Convers. Manag.* 48, 2169-2173, 2007
28. E. Chang; S. Yang, Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide, *Bot. Bull. Acad. Sinica* 43-52, 2003
29. C. Yoo; S.-Y. Jun; J.-Y. Lee, Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide, *Bioresour. Technol.* 101, S71-S74, 2010
30. W. Larcher, *Physiological Plant Ecology*, Springer Verlag, Berlin, 2008,
31. C. Posten; G. Schaub, Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels--A process view, *J. Biotechnol.* 142, 64-69, 2009
32. R. Ueda; S. Hirayama; K. Nakayama. 1996, U.S. Patent 5 578 472.
33. J. A. Costa; M. G. de Morais, The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae, *Bioresour. Technol.* 102, 2-9, 2011
34. S. Amin, Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae, *Energy Convers. Manag.* 50, 1834-1840, 2009
35. R. Harun; M. K. Danquah; G. M. Forde, Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production, *J. Chem. Technol. Biot.* 85, 199-203, 2010
36. Y. Ueno; N. Kurano; S. Miyachi, Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, *Chlorococcum littorale*, *J. Ferment. Bioeng.* 86, 38-43, 1998
37. R. Woods; J. Coleman; M. De, *Genetically modified cyanobacteria for the production of ethanol, the constructs and method thereof*. 2004, Enol Energy Inc. : United States of America.
38. <http://www.algenolbiofuels.com>
39. A. Singh; P. S. Nigam; J. D. Murphy, Mechanism and challenges in commercialisation of algal biofuels, *Bioresour. Technol.* 102, 26-34, 2011
40. S. I. Mussatto; G. Dragone; P. M. R. Guimarães, Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production, *Biotech. Adv.* 28, 817-830, 2010
41. S. S. Kapdi; V. K. Vijay; S. K. Rajesh, Biogas scrubbing, compression and storage: perspective and prospectus in Indian context, *Renew. Energy* 30, 1195-1202, 2005
42. L. Brennan; P. Owende, Biofuels from microalgae--A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sust. Energy Rev.* 14, 557-577, 2010

43. C. G. Golueke; W. J. Oswald, Biological Conversion of Light Energy to the Chemical Energy of Methane, *Appl. Environ. Microbiol.* 7, 219-227, 1959
44. J. H. Mussgnug; V. Klassen; A. Schlüter, Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept, *J. Biotechnol.* 150, 51-56, 2010
45. B. Sialve; N. Bernet; O. Bernard, Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable, *Biotech. Adv.* 27, 409-416,
46. M. L. Ghirardi; L. Zhang; J. W. Lee, Microalgae: a green source of renewable H₂, *Trends Biotechnol.* 18, 506-511, 2000
47. H. Gaffron; J. Rubin, Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae, *J. Gen. Physiol.* 219-240, 1942
48. R. Wünschiers; P. Lindblad, Hydrogen in education--a biological approach, *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1131-1140, 2002
49. A. Melis; M. R. Melnicki, Integrated biological hydrogen production, *Int. J. Hydrogen Energy* 31, 1563-1573, 2006
50. O. Perez-Garcia; F. M. E. Escalante; L. E. de-Bashan, Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products, *Water Res.* 45, 11-36, 2011
51. D. Song; J. Fu; D. Shi, Exploitation of Oil-bearing Microalgae for Biodiesel, *Chinese J. Biotechnol.* 24, 341-348, 2008
52. A. Demirbas; M. Fatih Demirbas, Importance of algae oil as a source of biodiesel, *Energy Convers. Manag.* 52, 163-170, 2011
53. J. Pruvost; G. Van Vooren; G. Cogne; J. Legrand, Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor, *Bioresour. Technol.* 100, 5988-5995, 2009
54. N. Courchesne; A. Parisien; B. Wang, Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches, *J. Biotechnol.* 141, 31-41, 2009
55. R. S. Rasmussen; M. T. Morrissey, *Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, L. T. Steve, Editor. 2007, Academic Press. p. 237-292.
56. P. Spolaore; C. Joannis-Cassan; E. Duran, Commercial applications of microalgae, *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87-96, 2006
57. H. Greenwell; L. Laurens; R. Shields, Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges, *J. R. Soc. Interface* 703-726, 2010
58. O. Pulz; K. Scheibenbogen, *Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input*, in *Bioprocess and Algae Reactor Technology*, *Apoptosis*. 1998, Springer Berlin. p. 123-152.
59. C. U. Ugwu; H. Aoyagi; H. Uchiyama, Photobioreactors for mass cultivation of algae, *Bioresour. Technol.* 99, 4021-4028, 2008
60. P. Schenk; S. Thomas-Hall; E. Stephens, Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production, *Bioenergy Res.* 1, 20-43, 2008
61. <http://www.algomed.de/media/publikationen/algomed01.pdf>
62. I. A. Guschina; J. L. Harwood, *Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry*, in *Lipids in Aquatic Ecosystems*, M. Kainz; M. T. Brett; M. T. Arts, Editors. 2009, Springer New York. p. 1-24.
63. P. Harrison; P. Thompson; G. Calderwood, Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton, *J. Appl. Phycol.* 2, 45-56, 1990

64. D. Pal; I. Khozin-Goldberg; Z. Cohen, The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1429-1441, 2011
65. H. Tatsuzawa; E. Takizawa; M. Wada, Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas* sp., *J. Phycol.* 32, 598-601, 1996
66. N. N. Sushchik; G. S. Kalacheva; N. O. Zhila, A Temperature Dependence of the Intra- and Extracellular Fatty-Acid Composition of Green Algae and Cyanobacterium, *Russian J. Plant Physiol.* 50, 374-380, 2003
67. R. Huerlimann; R. de Nys; K. Heimann, Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production, *Biotechnol. Bioeng.* 107, 245-257, 2010
68. Q. Hu; M. Sommerfeld; E. Jarvis; M. Ghirardi; M. Posewitz; M. Seibert; A. Darzins, Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *Plant J.* 54, 621-639, 2008
69. L. Rodolfi; G. Chini Zittelli; N. Bassi, Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100-112, 2009
70. A. P. Vyas; J. L. Verma; N. Subrahmanyam, A review on FAME production processes, *Fuel* 89, 1-9, 2010
71. S. Lestari; P. Mäki-Arvela; J. Beltramini, Transforming Triglycerides and Fatty Acids into Biofuels, *ChemSusChem.* 2, 1109-1119, 2009
72. A. Converti; A. A. Casazza; E. Y. Ortiz, Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Chem. Eng. Process.* 48, 1146-1151, 2009
73. S. Mandal; N. Mallick, Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 281-291, 2009
74. L. Gouveia; A. Oliveira, Microalgae as a raw material for biofuels production, *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 36, 269-274, 2009
75. Q. Hu, *Environmental Effects on Cell Composition*, in *Handbook of Microalgal Culture*. 2007, Blackwell Publishing Ltd. p. 83-94.
76. G. Ahlgren; P. Hyenstrand, Nitrogen limitation effects of different nitrogen sources on nutritional quality of two freshwater organism, *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) and *Synechococcus* sp. (Cyanophyceae), *J. Phycol.* 39, 906-917, 2003
77. N. O. Zhila; G. S. Kalacheva; T. G. Volova, Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*, *J. Appl. Phycol.* 17, 309-315, 2005
78. A. M. Illman; A. H. Scragg; S. W. Shales, Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme Microb. Technol.* 27, 631-635, 2000
79. J. Davies; A. Grossman, *Responses to Deficiencies in Macronutrients*, in *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, J. Rochaix; M. Goldschmidt-Clermont; S. Merchant, Editors. 2004, Springer Netherlands. p. 613-635.
80. L. L. Beer; E. S. Boyd; J. W. Peters, Engineering algae for biohydrogen and biofuel production, *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 264-271, 2009

81. M. Sheek; A. Rady, Effect of phosphorus starvation on growth, photosynthesis and some metabolic processes in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*, *Ann. Bot.* 35, 139-151 1995
82. K. I. Reitan; J. R. Rainuzzo; Y. Olsen, Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae, *J. Phycol.* 30, 972-979, 1994
83. F. Trainor; J. Cain; L. Shubert, Morphology and nutrition of the colonial green alga *Scenedesmus*: 80 years later, *Bot. Rev.* 42, 5-25, 1976
84. P. F. Egan; F. R. Trainor, Phenotypic plasticity in *Scenedesmus communis* (Chlorophyceae) relationship of *S. communis* to *S. Komarek*, *J. Phycol.* 26, 367-376, 1990
85. J. R. Cain; F. B. Trainor, Regulation of gametogenesis in *Scenedesmus obliquus*, *J. Phycol.* 12, 383-390, 1976
86. www.algabase.org
87. T. da Silva; A. Reis; R. Medeiros, Oil Production Towards Biofuel from Autotrophic Microalgae Semicontinuous Cultivations Monitorized by Flow Cytometry, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159, 568-578, 2009
88. R. Andersen, *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press, San Diego, 2005,
89. D. Gorman; R. Levine, Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 1665-1669, 1965
90. <http://www.animal.ufl.edu/hansen/Protocols/hemacytometer.htm>
91. P. Y. Contreras Pool, *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.*, in *Unidad de Energía Renovable*. 2010, Centro de Investigación Científica de Yucatán: Mérida, Yucatán. p. 127.
92. V. A. Herrera-Valencia; P. Y. Contreras-Pool; S. López-Adrián, L. F. Barahona-Pérez, The Green Microalga *Chlorella saccharophila* as a Suitable Source of Oil for Biodiesel Production, *Curr. Microbiol.* 1-7, 2011
93. D. L. Alonso; E.-H. Belarbi; J. M. Fernández-Sevilla, Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*, *Phytochemistry* 54, 461-471, 2000
94. G. S. Kalacheva; N. O. Zhila; T. G. Volova, The Effect of Temperature on the Lipid Composition of the Green Alga *Botryococcus*, *Microbiol.* 71, 286-293, 2002
95. J. Sheehan; T. Dunahay; J. Benemann, *A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae*. 1998, Nat. Renew. Energy Lab.: Cole Boulevard Golden, Colorado. p. 318.
96. R. Miller; G. Wu; R. R. Deshpande, Changes in Transcript Abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following Nitrogen Deprivation Predict Diversion of Metabolism, *Plant Physiol.* 154, 1737-1752, 2010
97. M. K. Kim; J. W. Park; C. S. Park, Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater, *Bioresour. Technol.* 98, 2220-2228, 2007
98. M. Chen; J. Li; X. Dai, Effect of phosphorus and temperature on chlorophyll a contents and cell sizes of *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa*, *Limnology* 1-6, 2010

99. M. Winkler; A. Hemschemeier; C. Gotor, [Fe]-hydrogenases in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation, *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1431-1439, 2002
100. G. Ramírez, *Utilización de microalgas para la remoción de Cadmio y Zinc de efluentes de aguas residuales urbanas*, in *Ecología Marina*. 2007, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada: Ensenada, Baja California, México. p. 83.
101. S. Fierro; M. del Pilar Sánchez-Saavedra; C. Copalcúa, Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*, *Bioresour. Technol.* 99, 1274-1279, 2008
102. D. Voltolina; H. Gómez-Villa; G. Correa, Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle, *Bioresour. Technol.* 96, 359-362, 2005
103. A. Ruiz-Marin; L. G. Mendoza-Espinosa; T. Stephenson, Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater, *Bioresour. Technol.* 101, 58-64, 2010
104. Y. Liang; N. Sarkany; Y. Cui, Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions, *Biotechnol. Lett.* 31, 1043-1049, 2009
105. C. Combres; G. Laliberté; J. S. Reysac, Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*, *Physiol. Plantarum* 91, 729-734, 1994
106. H. Tang; M. Chen; M. E. D. Garcia, Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production, *Biotechnol. Bioeng.* 108, 2280-2287, 2011
107. G. E. Fogg, Phosphorus in primary aquatic plants, *Water Res.* 7, 77-91, 1973
108. M. de Moraes; J. Costa, Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors, *Biotechnol. Lett.* 29, 1349-1352, 2007
109. Y. Gong; M. Jiang, Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel, *Biotechnol. Lett.* 33, 1269-1284, 2011
110. F. Trainor, The effect of composition of the medium on morphology in *Scenedesmus obliquus*, *Can. J. Bot.* 515-518, 1964
111. J. S. Davis, Aplanospores of *Scenedesmus*, *Trans. Am. Microsc. Soc.* 84, 335-338, 1965
112. C. Hagen; S. Siegmund; W. Braune, Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation *Eur. J. Phycol.* 37, 217-226, 2002
113. P. B. Heifetz; B. Förster; C. B. Osmond; L. J. Giles; J. E. Boynton, Effects of acetate on facultative autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* assessed by photosynthetic measurements and stable isotope analyses, *Plant Physiol.* 122, 1439-1446, 2000
114. J. Sánchez; J. Fernández-Sevilla; F. Ación, Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis* influence of irradiance, dilution rate and temperature, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 719-729, 2008
115. K. Gerhard, Biodiesel and renewable diesel: A comparison, *Prog. Energy Combust.* 36, 364-373, 2010