



Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C.

POSGRADO

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL CO₂ EN EL CRECIMIENTO Y
COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE TRES MICROALGAS EN
CONDICIONES DE FOTOBIORREACTOR

TESIS

Que como Requisito para obtener el Grado de Maestro en Ciencia
y Tecnología Ambiental presenta:

Mónica Hinojosa Castañeda

Directores de Tesis:

Dr. José Luis Stephano Hornedo

Dr. Erasmo Orrantia Borunda

Chihuahua, Chih. Julio 2012

ÍNDICE

Lista de Tablas	ii
Lista de Figuras.....	iii
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	5
1. Microalgas	5
1.1. Fotosíntesis	6
2. Microalgas como fuente de biocombustible	7
2.1. Biodiesel	8
2.2. Microalgas como fuente biológica de lípidos	12
3. Microalgas en la Mitigación de CO ₂	15
4. Microalgas para el tratamiento de aguas residuales.....	17
5. Bioproductos a partir de Microalgas	19
6. Producción de Microalgas.....	20
6.1. Requerimientos principales para el cultivo de Microalgas	22
6.2. Producción de Microalgas	43
7. Especies de Microalgas.....	28
7.1 <i>Chlorella</i>	28
7.2 <i>Scenedesmus</i>	28
Justificación	30
Objetivos.....	32
Materiales y Métodos	34
1. Cepas de microalgas	34
2. Identificación de <i>C. sorokiniana</i>	34
2. Cultivo de microalgas	40
3. Fotobioreactor	44
4. Cultivo de microalgas en fotobioreactor.....	50
5. Análisis de los cultivos.....	54
6. Análisis estadístico	61
Resultados y Discusiones	63
1. Cultivo de <i>C. vulgaris</i>	63
1.1. Crecimiento celular	66
1.2. Tasa de consumo de CO ₂	67
1.3. Análisis bioquímico.....	68
1.3.1 Lípidos	68
1.3.2. Proteínas.....	69
1.3.3. Carbohidratos	70

2. Cultivo de <i>S. dimorphus</i>	72
2.1. Crecimiento celular	72
2.2. Tasa de consumo de CO ₂	76
2.3. pH.....	77
2.4. Análisis bioquímico.....	79
2.4.1 Lípidos	79
2.4.2. Proteínas.....	81
2.4.3. Carbohidratos	82
3. Cultivo de <i>C. sorokiniana</i>	83
3.1. Crecimiento celular	83
3.2. Tasa de consumo de CO ₂	87
3.3. Análisis bioquímico.....	88
3.3.1. Lípidos	88
3.2.2. Proteínas.....	89
3.2.3. Carbohidratos	90
4. Aislamiento y Extracción de ADN.....	92
4.1. Reacción de la cadena polimerasa.....	63
4.1.2 Secuenciación	94
4.1.3 Análisis de secuencias e Identificación taxonómica.....	43
5. Discusiones Generales.....	98
Conclusiones.....	100
1. Recomendaciones	102
Referencias bibliográficas	103
Anexos.....	107

Lista de Tablas

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Contenido de lípidos de algunas microalgas	12
2. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de PCR	13
3. Composición del medio de cultivo Bristol-modificado.....	14
4. Composición de medio de Agua residual Sintética.....	16
5. Especificaciones del Fermentador Bio 2000	17
6. Efecto del CO ₂ en el crecimiento celular de <i>C. vulgaris</i>	18
7. Producción total y tasa de consumo de carbono de <i>C. vulgaris</i>	21
8. Efecto del CO ₂ en el crecimiento celular de <i>S. dimorphus</i>	24
9. Tasa de producción total y consumo de CO ₂ de <i>S. dimorphus</i>	28
10.Efecto de CO ₂ en el crecimiento celular de <i>C. sorokiniana</i>	36
11.Efecto del CO ₂ en la tasas de crecimiento <i>C. sorokiniana</i>	18
12.Tasa de crecimiento y productividad máxima de <i>C. sorokiniana</i>	24
13.Resultado de la secuenciación de los productos de PCR.....	28
14.Análisis e identificación molecular de <i>C. vulgaris</i>	36
15.Análisis e identificación molecular de la cepa aislada	36

Lista de Figuras

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Diagrama de la cubierta del vaso del fermentador.....	12
2. Esquema de componentes del vaso del fermentador.....	13
3. Sistema de fotobioreactor.....	14
4. Curva de calibración de carbohidratos.....	16
5. Curva de crecimiento de <i>C. vulgaris</i>	17
6. Curva de crecimiento específico de <i>C. vulgaris</i>	18
7. Contenido de lípidos en <i>C. vulgaris</i>	21
8. Contenido de proteínas en <i>C. vulgaris</i>	24
9. Contenido de carbohidratos en <i>C. vulgaris</i>	28
10. Curva de crecimiento de <i>S. dimorphus</i>	36
11. Curva de crecimiento específico de <i>S. dimorphus</i>	18
12. Evolución del pH de <i>S. dimorphus</i>	24
13. Contenido de lípidos en <i>S. dimorphus</i>	28
14. Contenido de proteínas en <i>S. dimorphus</i>	36
15. Contenido de carbohidratos en <i>S. dimorphus</i>	36
16. Curva de crecimiento de <i>S. dimorphus</i>	12
17. Crecimiento específico de <i>C. sorokiniana</i>	13
18. Contenido de Lípidos de <i>C. sorokiniana</i>	14
19. Contenido de Proteínas en <i>C. sorokiniana</i>	16
20. Contenido de carbohidratos en <i>C. sorokiniana</i>	17
21. Productos de PCR para los pares de cebadores empleados.....	18

RESUMEN

A consecuencia del cambio climático global, la investigación se ha centrado en la mitigación de gases de efecto invernadero. Las microalgas fotosintéticas han recibido considerable atención debido a su capacidad en la fijación de CO₂, para la producción de biodiesel y en la obtención de importantes bioproductos a partir de su biomasa.

Las microalgas *C. vulgaris*, *S. dimorphus* y la cepa aislada de agua residual e identificada molecularmente como *C. sorokiniana*, por el análisis de ADN ribosomal, fueron evaluadas en su crecimiento celular y composición bioquímica bajo diferentes condiciones de cultivo en fotobiorreactor con suministro de CO₂.

El aporte de CO₂ en el medio de cultivo, produjo un incremento en la concentración celular del 45.21% en *C. vulgaris*, del 34% en *S. dimorphus* y del 53% en la microalga *C. sorokiniana*, en comparación con los tratamientos control, suministrados con aire. De acuerdo al análisis bioquímico, en la cepa *C. vulgaris* se observó un incremento en el porcentaje de lípidos del 10 %, del 5% en la concentración de carbohidratos y en el contenido de proteínas se registró un decremento del 3%. En el cultivo de *C. sorokiniana*, se observó un incremento de proteínas del 13.5% y en la cepa *S. dimorphus*, un incremento del 24.5 %, en cuanto a las concentraciones de carbohidratos y lípidos registrados en las dos cepas, no presentaron diferencias significativas con el suministro adicional de CO₂.

Se considera que las tres cepas de microalgas, favorecen la biofijación de CO₂ al presentar una alta productividad, que está directamente relacionada con la tasa de consumo de dióxido de Carbono.

INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles son parte integral de la vida cotidiana del ser humano, permiten acelerar el desarrollo de los avances tecnológicos y mejorar el nivel de vida. Sin embargo, los combustibles fósiles provienen de fuentes no renovables que están limitados en el suministro y un día se agotarán (Lam y Lee, 2012), el agotamiento de éstas reservas ha provocado un aumento en la demanda y en el precio del combustible (Mutanda *et al.*, 2010).

Además, la quema de combustibles fósiles ha provocado numerosos problemas ambientales incluyendo la acumulación de gases de efecto invernadero (GEI) que contribuyen significativamente al calentamiento global (Lam y Lee, 2012; Amaro *et al.*, 2011; Naik *et al.*, 2010). El dióxido de carbono es uno de los principales GEI emitidos a la atmósfera (Chiu *et al.*, 2011), derivado principalmente de los sectores de la industria y producción de energía (Jacob *et al.*, 2010). Es necesario adoptar políticas y estrategias de mitigación para neutralizar el exceso de CO₂ en la atmósfera y minimizar los impactos del calentamiento global (Brennan y Owende, 2010; Ho *et al.*, 2010).

La biofijación de CO₂ por los cultivos masivos de microalgas se ha visto como una manera de ralentizar los efectos del calentamiento global. Representa un avanzado proceso biológico amigable con el ambiente, que permite la utilización directa de los flujos de CO₂ fósiles producidos por fuentes concentradoras en la conversión de combustibles renovables (Chisti, 2007).

El biodiesel ha recibido atención considerable en los últimos años, puesto que es un combustible renovable, biodegradable y no tóxico. Que aporta dióxido de carbono neto a la atmósfera y emite menos gases de

azufre y contaminantes que el petro-diesel (Widjaja *et.al.*, 2009; Demirbas, 2009). Esto se debe a que el CO₂ liberado en la quema del biocombustible es igual al CO₂ capturado por la biomasa durante la fotosíntesis y por lo tanto no aumenta las emisiones de CO₂ en la atmósfera (Lam y Lee, 2012). Según Chisti, (2008), el biodiesel a partir de microalgas tiene dos ventajas principales: la mitigación biológica del dióxido de carbono y su uso como sustituto del petro-diesel.

Otra ventaja es que las microalgas pueden ser cultivadas en agua de mar, agua salobre o en aguas residuales, eliminando así la competencia por el uso de agua dulce. A pesar de sus necesidades simples de crecimiento agua, CO₂, luz y nutrientes, similares a la de las plantas terrestres, las microalgas utilizan estos recursos de manera muy eficiente y por lo tanto presentan una alta productividad y el uso de agua es comparativamente bajo (Chisti Y., 2007).

Cultivar las microalgas cerca de una planta de energía, permitirá que las emisiones de CO₂ producidas a partir de la planta de energía puedan ser utilizadas como fuente de carbono para el crecimiento de las microalgas. De esa manera, las emisiones de carbono se reducirían, convirtiendo el reciclaje de residuos de CO₂ en biodiesel (Chisti Y., 2008.)

La combinación del cultivo de microalgas con el tratamiento de aguas residuales incrementa el beneficio ambiental de la mitigación del CO₂, resultando en la preservación de los valiosos recursos hídricos, debido a que continuamente, el agua residual sin tratar, se vierte a los cuerpos de agua resultando en la eutrofización de ríos y lagos (Wang *et al.*, 2008).

Yoo C. *et al.*,(2010) y Fan L. *et al.*, (2008) consideran que las microalgas fotosintéticas han atraído gran interés debido a la capacidad

de fijación de CO₂, la producción de biodiesel y la obtención de productos a partir de su biomasa.

Las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus dimorphus* y la cepa autóctona *Chlorella sorokiniana* aislada de agua residual doméstica fueron cultivadas en este estudio experimental. Los cultivos se realizaron en un fotobiorreactor con suministro de diferentes concentraciones de CO₂, bajo 3 condiciones de cultivo.

El objetivo del ensayo experimental, es evaluar los efectos del dióxido de carbono respecto a la producción de biomasa y la composición bioquímica de las microalgas: contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos acumulado durante el crecimiento celular.

ANTECEDENTES

1 Microalgas

Las microalgas son plantas primitivas (*thallophytes*), es decir, que carecen de raíces, tallos, hojas y no tienen cobertura estéril de células alrededor de las células reproductoras. Su desarrollo sencillo les permite adaptarse a las condiciones ambientales y prosperar a largo plazo (Brennan y Owende, 2010).

Las microalgas, son reconocidas como una de las más antiguas formas de vida, son microorganismos fotosintéticos procariotas o eucariotas, que crecen rápidamente y pueden vivir en condiciones extremas debido a su estructura celular simple. Están presentes en casi todos los ecosistemas de la tierra existentes, no sólo en medios acuáticos, sino también terrestres, representan una gran variedad de especies que viven en una amplia gama de condiciones ambientales (Mata *et al.*, 2009).

Las células procariotas (cianobacterias), carecen de núcleo y organelos unidos a la membrana (plástidos, núcleo, mitocondrias, aparato de Golgi), son más parecidas a las bacterias que a las microalgas. Las células eucariotas, forman parte de muchos tipos diferentes de microalgas comunes, tienen estos organelos que controlan las funciones de la célula, lo que les permite sobrevivir y reproducirse.

Los principales criterios para la categorización de las microalgas son la pigmentación, el ciclo de vida y la estructura celular básica. Los grupos más importantes de las microalgas en términos de abundancia son: las diatomeas, algas verdes, algas azul-verdes y las algas doradas (Brennan y Owende, 2010).

Las microalgas pueden ser organismos autótrofos o heterótrofos, los primeros utilizan la luz como fuente de energía para el crecimiento requieren de compuestos inorgánicos, tales como CO₂, mientras que los segundos son independientes de la luz y requieren de compuestos orgánicos (glucosa, acetatos, glicerol) como su fuente de carbono y energía. Algunas microalgas son mixotróficas, es decir, tienen la capacidad para realizar la fotosíntesis y adquirir nutrientes orgánicos exógenos (Mata *et al.*, 2010).

Todos los organismos fotosintéticos contienen pigmentos orgánicos para la recolección de energía de la luz. Hay tres clases principales de pigmentos: clorofilas (Chl), carotenoides y ficobilinas, cada uno difiere en su composición química y presenta diferente capacidad de absorción de la luz en una determinada longitud de onda. Las clorofilas (pigmentos verdes) y los carotenoides (pigmentos de color amarillo o naranja) son lipofílicos, mientras que ficobilinas son hidrófilas. Las microalgas contienen clorofila a como pigmento primario fotosintético (Brennan y Owende, 2010).

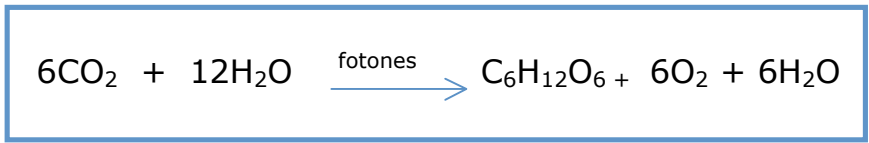
1.1 Fotosíntesis

La fotosíntesis representa un proceso único de conversión de energía solar. Prácticamente, todas las formas de vida en la tierra dependen directa o indirectamente de la fotosíntesis como fuente de energía para su metabolismo y crecimiento.

Durante la fotosíntesis, la energía capturada se utiliza en el ciclo de Calvin para producir carbohidratos mediante la utilización de moléculas de CO₂ y H₂O. Para fijar una molécula de CO₂ se necesitan un mínimo de 8 fotones de la luz (Quanta), es decir, una energía de 5.2×10^4 Julios es

necesaria para generar un mol de carbohidratos (CH₂O) y una molécula de H₂O (Brennan y Owende, 2010).

La reacción de la fotosíntesis puede expresarse como sigue:



Para las microalgas autótrofas, la fotosíntesis es un componente clave de su supervivencia, convierten la radiación solar y el CO₂ absorbido por los cloroplastos en adenosintrifosfato (ATP), la energía útil a nivel celular, y O₂ que posteriormente se utiliza en la respiración para los procesos metabólicos (Brennan y Owende, 2010).

Las microalgas son los organismos con mayor eficiencia fotosintética comparados con cualquier planta, crecen extremadamente rápido y llegan a acumular grandes cantidades de diversos productos. Se consideran útiles para la biofijación de dióxido de carbono, el principal gas de efecto invernadero. Además son consideradas como fuente de biocombustibles de tercera generación, puesto que pueden ser utilizadas para producir biodiesel (Chisti, 2007).

2 Microalgas como fuente de biocombustible

La microalgas pueden ser utilizadas para producir una amplia gama de biocombustibles, tales como el biodiesel, bioetanol, biometano y biohidrógeno (Schenk *et al.*, 2008).

La bioenergía a partir de microalgas incluye: (i) el biogás producido a través de la digestión anaeróbica o co-digestión de biomasa de microalgas, (ii) la electricidad mediante la combustión directa de biomasa o indirectamente a través de la combustión de los derivados de microalgas, (iii) el biodiesel después de la extracción de aceite y de esterificación, (iv) el etanol por fermentación y (v) los combustibles líquidos a través de conversiones termoquímicas, como pirólisis, la gasificación o la licuefacción. La mayoría de los estudios de bioenergía que pertenecen a las microalgas se han centrado en la producción de biodiesel, porque éste se percibe generalmente como la tecnología mas viable para comercializarse (Kumar *et al.*, 2010).

2.1 Biodiesel

La incertidumbre en la disponibilidad de los combustibles fósiles, se considera un detonante importante para buscar fuentes alternativas de energía que puedan complementar o sustituirlos (Mutanda *et al.*, 2010). Como alternativa eficaz, los biocombustibles pueden ayudar a reforzar la seguridad energética y reducir las emisiones nocivas a la atmosfera, con la consiguiente disminución de los efectos globales de la contaminación (Balat y Balat, 2010; Gouveia y Oliveira, 2009; Widjaja *et.al.*, 2009).

El biodiesel está definido por la norma ASTM, Sociedad Americana para Pruebas y Materiales, como "un combustible compuesto de ésteres mono-alquilo de cadena larga de ácidos grasos derivados de aceites vegetales o grasas animales". Puede usarse en su forma pura (B100) o en mezclas con diesel fósil (BX). Las materias primas de origen vegetal

y animal, utilizadas para producir biodiesel son conocidos como triglicéridos (TG).

El biodiesel se produce habitualmente por un proceso conocido como transesterificación, los TGs se hacen reaccionar con alcoholes, para producir biodiesel. Varios aceites han sido utilizados en diferentes países como materias primas para la producción de biodiesel, debido a su propia disponibilidad (Demirbas, 2008). Actualmente, el biodiesel se produce a partir de diferentes cultivos, tales como, soja, colza, girasol, palma, coco, jatropha, Karanja, el aceite usado frito y las grasas animales (Mutanda *et al.*, 2010).

En la producción de biodiesel de primera generación, los aceites vegetales comestibles se utilizan como materia prima principal. Sin embargo, el uso de aceites comestibles como fuente de energía está en conflicto con la utilización para alimento humano, lo que ha aumentado las objeciones por parte de organizaciones públicas y no gubernamentales (Lam M. y Lee K., 2012).

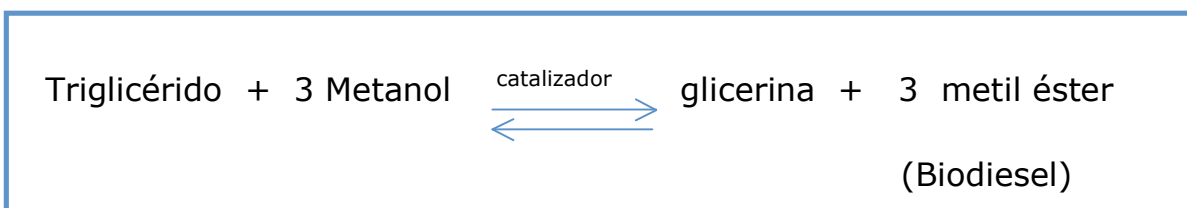
El biodiesel debe ser rentable, producido a partir materias primas de bajo costo como aceites no comestibles, aceites usados y grasas animales. Sin embargo, las cantidades disponibles de los aceites usados y grasas animales no son suficientes para coincidir hoy con la demanda de biodiesel (Mata T. *et al*, 2009).

El biodiesel de segunda generación derivado de aceites no comestibles como la *Jatropha curcas* aparece como una materia prima alternativa atractiva para la industria del biodiesel, los árboles de jatropha pueden crecer fácilmente en tierras no cultivables o terrenos baldíos. Sin embargo su utilización como biocombustible presenta varias desventajas, el aceite de jatropha contiene una mayor concentración de

ácidos grasos libres (AGL) que pueden requerir un pre-tratamiento adicional en el proceso de biodiesel, para su cultivo se requiere de fertilización, regular el riego y buenas prácticas de gestión para asegurar un alto rendimiento de aceite (Lam *et al.*, 2009).

El cultivo de plantas terrestres se ve limitado por las grandes extensiones de terreno necesarias para la producción de semillas oleaginosas, los cultivos son dependientes de la estación del año y su ubicación geográfica (Chisti, 2011; Mata T. *et al.*, 2009). Debido a estas debilidades, la búsqueda de una materia prima de biodiesel más sostenible continúa y se centra ahora en las microalgas (Lam y Lee, 2012).

El biodiesel es un combustible alternativo para motores diesel que se produce mediante la reacción química de un aceite vegetal o grasa animal con un alcohol mediante la reacción de transesterificación. En este proceso se transforma una molécula de ácidos grasos (triglicérido), producidos por la especie de interés, en tres moléculas de metil ésteres al reaccionar con tres moléculas de alcohol (metanol) en presencia de un catalizador (ácido, alcalino o biológico), que tiene como función disminuir el tiempo de la reacción química (Sharma *et al.*, 2008).
Reacción:



La transesterificación es una reacción química múltiple que incluye los pasos de hidrólisis reversibles en serie, en el que los triglicéridos se

convierten en diglicéridos; a continuación, los diglicéridos se convierten en monoglicéridos, y finalmente los monoglicéridos se convierten en ácidos grasos y glicerol (como subproducto); seguido por re-esterificación con un alcohol de cadena corta (normalmente metanol), para garantizar una alta volatilidad (Amaro et al., 2011).

Un exceso de metanol se utiliza para forzar la reacción a favor del lado derecho de la ecuación. El metanol en exceso es posteriormente recuperado y reutilizado (Dermibas, 2011).

La principal ventaja de la utilización de fuentes renovables para la producción de biocombustibles es la utilización de los recursos biológicos naturales (que están geográficamente más repartidos que los combustibles fósiles) y la bioenergía producida proporciona la independencia y la seguridad del abastecimiento energético (Nigam y Singh, 2011).

Diversas materias primas se han utilizado para producir biodisel, incluyendo plantas, microalgas y grasa animal. Las microalgas tienen ciertas ventajas en comparación con otros cultivos energéticos, incluyendo un tiempo de crecimiento más corto, alta producción de biomasa y el reducido uso de la tierra para su cultivo (Lee et al., 2010).

Las microalgas han sido propuestas como las mejores candidatas en la producción de biocombustible por sus ventajas de una mayor eficiencia fotosintética, mayor producción de biomasa, alto contenido de lípidos y mayor tasa de crecimiento en comparación con otros cultivos energéticos (Chisti, 2007; Widjaja et al., 2009).

El cultivo de microalgas tiene una verdadera huella ecológica pequeña, dado que requiere una superficie de 1-2 órdenes de magnitud menores en comparación a los cultivos convencionales. Requiere de 1.5 a 3.2

millones de hectáreas para satisfacer el 50% de la demanda de energéticos de transportación en U.S.A. (Chisti, 2007). En México, se ha estimado que sólo se requiere el 1% de la superficie total del país, para cubrir el 100% de la demanda actual de diesel de petróleo (Garibay *et al.*, 2009).

2.2 Microalgas como fuente biológica de lípidos

Una de las mayores fuentes de energía en las cadenas tróficas acuáticas se encuentra almacenada en forma de lípidos dentro de las microalgas. Las microalgas contienen lípidos y ácidos grasos como componentes de la membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuentes de energía. Los componentes y el contenido de lípidos en las células de microalgas varían de una especie a otra (Tabla 1). Muchas especies de microalgas pueden ser inducidas a acumular sustancial contenido de lípidos, aunque el contenido medio de lípidos varían entre 1% y 70%, algunas especies puede alcanzar el 90% (peso seco) bajo ciertas condiciones (Amaro *et al.*, 2011).

Tabla 1. Contenido de Lípidos de algunas microalgas (*Amaro et al., 2011*)

	Especie de Microalga	Contenido de lípidos (% Peso seco)
Agua dulce	<i>Botryococcus sp.</i>	25.0 -75.0
	<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6
	<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6-57.8
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0-22.0
	<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0 - 58.0
	<i>Chlorella sp.</i>	18.0 - 57.0
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0 - 55.0
	<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6 - 21.1
Marina	<i>Dunaliella salina</i>	6.0 - 25.0
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.7 - 71.0
	<i>Dunaliella sp.</i>	17.5 - 67.0
	<i>Isochrysis galbana</i>	7.0 - 40.0
	<i>Nannochloris sp</i>	60.9 - 76.5
	<i>Nannochloropsis oculata</i>	20.0 - 56.0
	<i>Nannochloropsis sp</i>	22.7 - 29.7
	<i>Neochloris oleoabundans</i>	84.0 - 142.0

La característica distintiva más importante del aceite de microalgas, es su rendimiento y por lo tanto su rendimiento en biodiesel. Según algunas estimaciones, el rendimiento (por acre) de aceite de microalgas es 200 veces más que el mejor rendimiento de aceites vegetales (Demirbas, 2009).

La fracción lipídica puede dividirse en dos grupos principales: los lípidos polares (incluyen los glicolípidos y fosfolípidos) y los lípidos neutros (incluyen a los triglicéridos, diglicéridos y esteroides). La mayoría de los lípidos microalgales son lípidos polares y triglicéridos (TG). Los TG pueden llegar a constituir hasta el 80% de los lípidos en microalgas eucariotas. Las vías de síntesis de triglicéridos en microalgas puede

consistir en los siguientes tres pasos: (a) la formación de acetil coenzima A (acetil-CoA) en el citoplasma, (b) la elongación y desaturación de cadena de carbono de los ácidos grasos, y (c) la biosíntesis de los triglicéridos (Huang *et al.*, 2009).

Las características de crecimiento y la composición de las microalgas dependen en gran medida de las condiciones del cultivo. Algunas especies de microalgas, al ser alteradas las condiciones de cultivo o al inducir a la microalga a una situación de stress impuesta por estímulos ambientales, son capaces de acumular hasta un 50-70% de lípidos por peso seco (Mata *et al.*, 2009).

Los principales estímulos son la deficiencia de nutrientes (privación de nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), salinidad, intensidad en la iluminación, cambios de temperatura y pH, concentración de hierro. La privación de nitrógeno ha sido el factor más estudiado, Ming *et al.* (2010) consideran que en realidad otros factores, como la concentración de CO₂ y la intensidad de la luz, pueden también desempeñar un papel importante en la producción de biomasa como en el contenido de lípido en las microalgas.

El carbono inorgánico (CO₂), y las fuentes orgánicas de carbono (glucosa, acetato) pueden ser utilizadas por microalgas para la producción de lípidos (Huang *et al.*, 2009).

Muradyan *et al.* (2004), han informado que a lo largo de un día el aumento de CO₂ del 2 al 10%, provocó un aumento del 30% en la cantidad de ácidos grasos de *Dunaliella salina*, mientras que un aumento a lo largo de 7 días podría resultar 2.7 veces mayor contenido de lípidos (Ge Y., *et al.*, 2010). El contenido de lípidos de *Chlorella Fusca*

y *Phaeodactylum tricornutum*, aumentó cuando las células se cultivaron en concentraciones cada vez mayores de CO₂ (Chiu *et al.*, 2008).

3 Microalgas en la mitigación de CO₂

La preocupación por el aumento de dióxido de carbono en el medio ambiente ha sido un problema desde hace varias décadas. (Powell E. y Hill G., 2010). Desde 1990, se han realizado una variedad de estudios de investigación de diferentes estrategias para el secuestro de CO₂, de las cuales, los métodos biológicos, en particular la biofijación utilizando microalgas en fotobiorreactores, ha ganado actualmente renovado interés. Las microalgas tienen una mayor capacidad fotosintética que las plantas terrestres, lo cual plantea la posibilidad de utilizar con efectividad el CO₂ (Fan L. *et al.*, 2008).

Las microalgas son excelentes captadoras de CO₂. Se estima que por cada tonelada producida de biomasa microalgal (peso seco), se consumen de 1.3 a 1.8 toneladas de CO₂ (Chisti, 2008). Anteriormente, se asumía que las microalgas eran sensibles a las altas concentraciones de CO₂, sin embargo, ahora se reportan algunas microalgas que crecen rápidamente, incluso en concentraciones muy elevadas, alrededor de 1,000 veces mayor que el nivel del ambiente (0.036%), que pueden fijar fácilmente a la biomasa de las microalgas verdes unicelulares (Morais y Costa, 2007).

En las emisiones primarias de los gases de combustión, se encuentran concentraciones entre el 3% y 15% de CO₂ ; en función de la fuente de

combustible y el diseño de la planta, en las plantas de carbón suelen tener más altas emisiones de CO₂ (Packer, 2009).

Se ha demostrado, que es técnicamente factible utilizar el CO₂ de los gases de combustión como fuente de carbono para el cultivo de microalgas, que pueden transformar el dióxido de carbono del aire y la energía de la luz a través de la fotosíntesis a diversas formas de energías químicas tales como polisacáridos, proteínas, lípidos e hidrocarburos (Chisty, 2007).

Un análisis con *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella kessleri*, cepas aisladas de un estanque de tratamiento de una planta de energía termoeléctrica a carbón en Brasil, mostró un potencial particularmente elevado para la bio-fijación de CO₂ (Amaro *et al.*, 2011).

Según Packer (2009), otros componentes de los gases de combustión deben de considerarse, en especial los óxidos de nitrógeno (NO_x) y los metales de azufre (SO_x); están presentes también en niveles mucho más bajos, el níquel (Ni), vanadio (V) y el mercurio (Hg) de acuerdo al combustible utilizado. Los resultados de estudios utilizando mezclas de gases que simulan las emisiones de gases de combustión, sugieren que los niveles de (NO_x) presentes no suponen ningún problema para el crecimiento de microalgas. Los estudios también muestran que el principal impacto es por parte de los (SO_x) en el pH del cultivo, a través de la formación de ácidos sulfurosos, que pueden llegar a ser un problema para algunas especies si la concentración de gases de combustión de (SO_x) está por encima de 400 ppm.

Así mismo, se encontró que la cepa de *Chlorella* es capaz de crecer en diferentes concentraciones y combinaciones de (SO_x) y NO_x. Sin

embargo, los SOx pueden ser removidos de los gases de combustión antes del contacto con las microalgas a través de desulfuración química (Ono y Cuello 2006). Tang *et al.*, (2011), reportó que tanto *S. oblicuos* y *C. pyrenoidosade* pudieron crecer bien en las concentraciones de 5% a 30% de CO₂.

En estudios con cultivos de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*, se obtuvo alta productividad de biomasa con la presencia de un 6 % y 12% de CO₂ de una planta termoeléctrica de carbón, y fueron capaces de crecer en un medio que contiene hasta un 18% de CO₂. Estudios recientes han reportado que las cepas de *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Botryococcus braunii* son algunas de las microalgas que han mostrado resultados prometedores para bio-mitigar las emisiones de CO₂ con una tasa típica de consumo de CO₂ de 200 a 1,300 mg L⁻¹día⁻¹ (Chiu *et al*, 2008; Yoo *et al*, 2010; Zhao *et al*, 2011).

4 Microalgas para el tratamiento de aguas residuales

Considerando que una de las limitaciones actuales en la producción masiva de microalgas es aun el alto costo de producción, el uso de aguas residuales como fuente de nutrientes en su cultivo en la producción de biodiesel, es una alternativa bastante promisoriosa y ambientalmente sustentable (Powell *et al.*, 2008).

El cultivo de microalgas en aguas residuales, provee un incentivo adicional debido a que las microalgas son capaces de remover eficientemente del agua el nitrógeno y el fósforo, así como algunos metales pesados (Powell *et al.*, 2008).

Debido a la capacidad de las microalgas para tratar varios tipos de contaminantes, las especies autóctonas pueden ser utilizadas como una excelente opción cuando los nutrientes tales como nitrógeno y fósforo tienen que ser eliminados. Lv *et al.*, (2010), afirman que un sistema de microalgas puede ser empleado como un proceso de tratamiento secundario alternativo para la eliminación simultánea de nutrientes y materia orgánica de las aguas residuales.

Estudios recientes han reportado que muchas especies de microalgas, en particular *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* y *Chlorella*, pueden asimilar compuestos orgánicos parcialmente degradados en condiciones de luz (mixotrofia) y también son capaces de un crecimiento heterotrófico en moléculas simples, como la glucosa y los ácidos orgánicos en la oscuridad. Se ha sugerido que un sistema de microalgas se pueden emplear como un proceso de tratamiento secundario alternativo para la eliminación simultánea de nutrientes y materia orgánica de aguas residuales.

En otro caso, *Chlorella vulgaris* se cultivó en las aguas residuales de una planta de fabricación de acero, con el objetivo de desarrollar un sistema económicamente viable para eliminar el amoníaco de las aguas residuales y el CO₂ del gas de combustión (Huang *et al.*, 2009).

Las ventajas del uso de microalgas para este fin incluyen el bajo costo de operación, la posibilidad de reciclar el nitrógeno y el fósforo asimilado en la biomasa de microalgas como nutrientes, evitar un problema de manejo de lodos y la descarga del efluente oxigenada en el cuerpo de agua.

5 Bio- productos a partir de microalgas

El uso de microorganismos y sus productos metabólicos por los seres humanos, es uno de los campos más significativos de las actividades biotecnológicas. El conocimiento de la actividad de los microorganismos en la conversión de determinadas sustancias en otros, es de gran importancia, como es la posibilidad de utilizar una amplia variedad de sustratos viables para productos y subproductos. En México, los antiguos aztecas recogían las algas del género *Spirulina* de los lagos alcalinos para el consumo de alimento. El cultivo comercial de las microalgas comenzó hace muchos años, las principales especies fueron *Chlorella*, *Spirulina*, que se utiliza como alimento, *Dunaliella* salina para la extracción de β -caroteno, *Haematococcus pluvialis* para la extracción de astaxantina y varias otras especies, que se utilizan como alimento en la acuicultura (Veráis y de Morais, 2011).

La biomasa resultante, después de la extracción del aceite, puede ser procesada en etanol o metano para ser utilizados como biocombustible, puede ser útil en la alimentación del ganado, como abono orgánico debido a su alta relación Nitrógeno:Fósforo, o simplemente para la cogeneración de energía (electricidad y calor) al ser incinerada. Por otra parte, una amplia gama de productos de química fina como los ácidos grasos polinsaturados, proteínas, antioxidantes y colorantes naturales, pueden extraerse de la biomasa, dependiendo de la especie en cuestión (Amaro H. *et al.*, 2011).

Productos químicos industriales extraídos de microalgas incluyen: (i) glicerol, que se emplean ampliamente en productos de cuidado personal y alimentos; (ii) astaxantina y otros carotenoides, que se utiliza como

antioxidantes y colorantes en los alimentos, cosméticos y acuicultura; (iii) los ácidos grasos, en productos cosméticos; (iv) poli- β -hidroxibutirato, utilizada en los plásticos; y (V) los polisacáridos, tales como agar, alginatos y carragenanos, que se emplean como agentes espesantes para alimentos.

6 Producción de Microalgas

6.1 Requerimientos principales para el cultivo de microalgas.

La luz es el factor principal en el crecimiento y productividad de las microalgas. Mediante el proceso de la fotosíntesis, los compuestos inorgánicos y la energía de luz se convierten en materia orgánica.

El efecto de la temperatura en las reacciones bioquímicas hace que sea uno de los factores ambientales más importantes que influyen en la composición bioquímica de las microalgas.

El pH del medio, influye tanto en la proporción de las especies del equilibrio químico del CO_2 , y por tanto, en la alcalinidad, como en la forma química en que se encuentran algunos nutrientes y micronutrientes. Cada especie de microalga necesita un cierto rango de pH en el cual su crecimiento es óptimo, dependiendo de qué especies químicas esté más habituada a asimilar.

La agitación de los cultivos fototróficos, es de gran importancia para la productividad fotosintética. El mezclado, asegura los usos eficientes de la luz, nutrientes e intercambio gaseoso formado en torno a la actividad metabólica de las microalgas. Es un requisito básico en el mantenimiento de las células bien dispersadas en el medio de cultivo. La

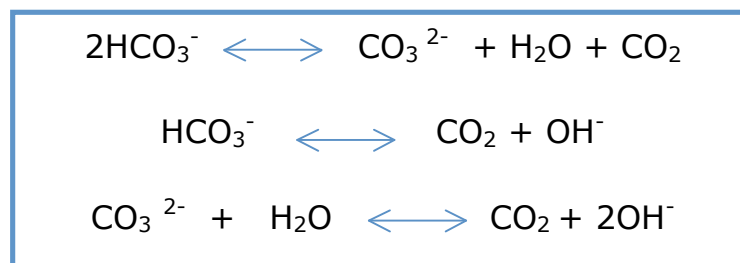
sedimentación o acumulación de materia orgánica en las zonas muertas del reactor afecta el deterioro celular y la descomposición anaeróbica, lo que puede provocar un colapso del cultivo.

6.1.1 Nutrientes

Carbono. La fuente de carbono como CO_2 o HCO_3^- , es el principal macronutriente útil en la actividad fotosintética.

El sistema de equilibrio $\text{CO}_2 - \text{H}_2\text{CO}_3^*$, $\text{HCO}_3^- - \text{CO}_3^{2-}$, es el mecanismo amortiguador más importante presente en las aguas dulces, y el mejor modo de controlar y mantener un nivel específico de pH óptimo para cada especie.

El sistema bicarbonato-carbonato puede aportar CO_2 para la fotosíntesis mediante las siguientes reacciones:



Nitrógeno. Después del Carbono, el nitrógeno es el nutriente más importante que contribuye a la producción de biomasa. Es un componente esencial de todas las proteínas estructurales y funcionales en las células de microalgas. Las fuentes de nitrógeno utilizadas son especialmente el nitrato, amoníaco y urea.

Fósforo. El fósforo es otro macronutriente importante que juega un papel importante en procesos metabólicos celulares mediante la formación de muchos de los componentes estructurales y funcionales necesarios para el crecimiento y desarrollo normal de las microalgas. La forma preferida en la que se suministra a las algas es como ortofosfato (PO_4^{2-}). La proporción de N:P en el medio de crecimiento es importante, ya que no sólo determina el potencial de la productividad, también es fundamental para mantener el dominio de las especies en los cultivos.

Macro y micronutrientes. Los elementos de importancia utilizados por las microalgas son también los macronutrientes K, Mg, Na, Fe, Ca, S y elementos traza tales como B, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, V y Se. Entre los elementos esenciales de minerales traza, el hierro juega un papel importante en la composición bioquímica celular, debido a sus propiedades redox y la implicación en los procesos fundamentales tales como la fotosíntesis, la respiración, la fijación de nitrógeno y la síntesis de ADN.

6.2 Producción de microalgas

El proceso de producción de microalgas se compone de cuatro procesos principales: el cultivo, cosecha, extracción de los lípidos y la conversión de aceite a los productos finales (por ejemplo el biodiesel) (Khoo H. *et al.*, 2011).

6.2.1 Cultivo de Microalgas

La producción de microalgas, se puede realizar tanto en reactores cerrados, generalmente llamados fotobiorreactores (FBRs) o en sistemas abiertos, conocidos como *raceways* o lagunas abiertas. El diseño de fotobiorreactor cerrado es similar a los fermentadores convencionales, pero cuentan con un suministro de luz y dióxido de carbono.

Los FBR, surgen como una opción viable para el cultivo de microalgas debido a las desventajas que presentan las lagunas abiertas en cuanto a que: a) requieren de grandes áreas de terreno, b) sufren importantes pérdidas de agua por evaporación y de CO₂ por difusión a la atmósfera, c) el sistema de mezclado es deficiente lo que origina una baja productividad, d) contaminación con otras algas y/o por organismos que se alimentan de microalgas, e) costosa recuperación del producto de medios diluidos, y f) dificultad para el control de la temperatura y el pH.

Los FBR permiten un control más preciso de las condiciones de cultivo y por lo tanto la obtención de la productividad de biomasa es alta, logrando 13 veces más que la de un estanque abierto en promedio (Chisti Y., 2007). Sin embargo, son mucho más costosos, lo que impide en ocasiones su utilización para la producción de biomasa. El resultado de esta situación es que los procesos desarrollados en reactores cerrados no son rentables todavía a gran escala.

La cosecha de biomasa a partir de FBR es menos costosa, debido a que la biomasa de microalgas es aproximadamente 30 veces más concentrada que la que se encuentra en las lagunas abiertas (Chisti,

2007). La diferencia entre los dos sistemas de cultivo es la compensación de los costos contra el control que se tiene de las condiciones para el cultivo, y la principal diferencia en un FBR es la de minimizar la contaminación del cultivo (Packer, 2009).

Una manera de evitar algunas de las principales desventajas del uso de las lagunas abiertas y de los FBRs, es optar por un cultivo que integra ambos sistemas: el sistema de cultivo híbrido (Schenk *et al.*, 2008). La combinación de ambos sistemas es probablemente la elección más adecuada para obtener la mayor productividad, tanto de biomasa como de lípidos, tomando en cuenta que la mayoría de las microalgas no acumulan biomasa ni producen lípidos de manera simultánea.

Este sistema se realiza en dos etapas, en la primera se incrementa la densidad celular y en la segunda se incrementa la acumulación de lípidos. La primera etapa se lleva a cabo en sistemas cerrados, para obtener la mayor densidad celular posible y minimizar el riesgo de contaminación, bajo condiciones de suficiencia de nutrientes. La segunda etapa se realiza en lagunas abiertas usando el cultivo producido en el primer paso y se estimula la acumulación de lípidos bajo condiciones de limitación de nutrientes. El resultado esperado es una alta densidad celular y un alto contenido de aceite.

6.2.1.1 Determinación de lípidos: Rojo Nilo

El rojo Nilo es un compuesto fluorescente *9-dietilamino-5H-benzo[a]fenoxazina-5-* soluble en lípidos, que se ha empleado con frecuencia para evaluar el contenido de lípidos de las células de mamíferos, levaduras, microalgas y zooplancton. La mayoría de los estudios han

proporcionado sólo un análisis cualitativo o semi-cuantitativo de los lípidos (Chen *et al.*, 2011).

El rojo Nilo se disuelve en los lípidos que se desea detectar y puede aplicarse a microalgas vivas en un medio de cultivo líquido. Es una técnica útil en la medición de lípidos *in situ*, que ha generado atención debido a que los procedimientos tradicionales para el análisis de lípidos, requieren grandes cantidades de muestras de algas, y deben garantizar la completa extracción, evitar la descomposición y / o la oxidación de los componentes lipídicos.

La medición de lípidos neutros con la aplicación de *rojo Nilo*, no permite comparar cuantitativamente el contenido lipídico y no provee valores absolutos a menos que se lleve a cabo una estandarización, y se utilice una técnica gravimétrica que permita evaluar el contenido lipídico en base al peso por célula, o mediante el uso de lípidos estandarizados. Un inconveniente importante es el tiempo e intensiva labor de mano de obra, lo que hace difícil para analizar un gran número de cepas de algas rápidamente (Chen *et al.*, 2011).

6.2.2 Proceso de Cosecha

El propósito de la cosecha es la remoción de agua y concentración de las células microalgales para su posterior procesamiento.

Los métodos más comunes de cosecha de biomasa incluyen centrifugación (especialmente en el caso de las microalgas unicelulares), filtración cuando se han formado flóculos o se trata de microalgas o cianobacterias relativamente grandes o filamentosas, y en algunos casos sedimentación por gravedad, flotación o técnicas de electroforesis.

Sin embargo, la centrifugación es el proceso más costoso y generalmente se aplica sólo cuando se recuperan metabolitos de alto valor agregado. La aplicación de la técnica depende de las propiedades de la especie de microalga cultivada, ya que algunas presentan características que facilitan su recolección.

6.2.3 Extracción de los lípidos

La extracción de los lípidos intracelulares se puede realizar con o sin rompimiento celular previo. El rompimiento celular puede llevarse a cabo por métodos tradicionales, como el uso de la "prensa francesa" que utiliza altas presiones, o por un método más moderno que es la electroporación, en el cual se aplica un campo eléctrico a las células para lograr perforaciones en su pared celular. La extracción de los lípidos se puede realizar con solventes químicos en una o dos etapas o mediante fluidos supercríticos.

La extracción de solventes químicos es el método más común utilizado para extraer los lípidos a partir de biomasa de microalgas. Esto se debe a que el disolvente químico tiene una alta selectividad y solubilidad hacia lípidos y por lo tanto, incluso los lípidos internos pueden ser extraídos mediante difusión a través de la pared celular de las microalgas. Sin embargo, las desventajas de la utilización de disolventes químicos se refieren principalmente a su alta toxicidad para el humano y el medio ambiente. Disolventes químicos tales como n-hexano, metanol, etanol y la mezcla de metanol-cloroformo (2:1 v / v) (método Bligh y Dyer), son eficaces para extraer los lípidos microalgas, pero la eficiencia de extracción es altamente dependiente de las cepas microalgas (Lam y Lee, 2012).

El principio básico de la extracción de fluidos supercríticos, es alcanzar una cierta fase (supercrítica) que está más allá del punto crítico de un fluido, *en el que menisco* de separación de las fases líquida y vapor desaparece, dejando sólo una sola fase homogénea. En fase supercrítica, las propiedades termofísicas tales como la densidad, viscosidad, difusividad y constante dieléctrica de un fluido, cambian drásticamente dependiendo de la temperatura y presión. En consecuencia, los cambios de las propiedades termofísicas transforman el líquido en un super-disolvente y por tanto, mejoran la extracción y eficacia de la reacción.

Varios fluidos supercríticos que actualmente están siendo explorados son el etileno, el CO₂, el etano, el metanol, el etanol, el benceno, en tolueno y el agua. Las principales desventajas de CO₂ supercrítico se asocian con altos costos de operación y las cuestiones relacionadas con la seguridad.

6.2.4 Producción de biodiesel

Existen cuatro formas principales para la elaboración del biodiesel, el uso directo y mezcla, microemulsiones, "*carcking*" térmico (pirólisis) y la transesterificación. La forma más común es la transesterificación, puesto que el biodiesel a partir de transesterificación se puede utilizar directamente o como mezcla con el combustible diesel (Widjaja *et al.*, 2009).

7 Especies de microalgas

7.1 *Chlorella*

Pertenece a la división *Chlorophyta*, conocidas como algas verdes. Son microalgas de agua dulce, eucariotas y unicelulares. Las especies de *Chlorella* son inmóviles al estar desprovistas de flagelos, tienen pared celular con hemicelulosa y son de forma esférica con un diámetro de entre 2 a 10 μm .

Chlorella vulgaris, es altamente utilizada para producir biodiesel debido a su relativa facilidad de cultivo y altas tasas de producción. Han sido evaluadas con fines alimenticios debido a su valor nutricional. Estudios anteriores habían mostrado que *Chlorella sp.* fue una de las tres especies de mayor tasa en la producción en estanques abiertos, ya que eran difíciles de ser contaminados por otros microorganismos (Lv J-M. *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2009).

7.2 *Scenedesmus*

Microalga verde perteneciente a la familia *Scenedesmaceae*, de agua dulce, eucariota y unicelular. Son no mótils, pueden encontrarse solitarias o formando cenobios.

Scenedesmus dimorphus es conocida por su capacidad de soportar elevadas concentraciones de nutrientes contenidos en las aguas residuales, poseer actividad metabólica elevada y capacidad de resistir variaciones ambientales, lo que la hacen sobrevivir y ser un género común de aguas residuales.

7.3 Medio de cultivo

Incrementar la productividad en fotobiorreactores es uno de los desafíos a vencer, adecuar las condiciones óptimas de crecimiento y balancear los medios de cultivos que favorezcan la productividad son esenciales para reducir el tiempo de retención y obtener altas densidades. El hierro ha demostrado ser un factor clave en el aumento de la biomasa del fitoplancton en las aguas oceánicas (Liu *et al.*, 2008). Las aguas residuales pueden contener abundantes nutrientes (por ejemplo, los hierros inorgánicos) que son necesarios para el crecimiento de microalgas (Huang *et al.*, 2009).

Liu *et al.* (2008), reportaron que en el cultivo de *C. vulgaris* alcanzando la fase final del crecimiento exponencial, la adición de FeCl_3 dentro del medio de cultivo prolongó el período de la fase de crecimiento exponencial y aumentó la densidad final de células.

JUSTIFICACIÓN

Desde hace algunas décadas, se conoce la estrecha relación entre el aumento continuo de las emisiones de CO₂ a la atmósfera y el cambio climático global, y se considera que los combustibles fósiles son el mayor contribuyente de gases de efecto invernadero (GEI). Se estima que los procesos naturales remueven sólo alrededor de un 40% del CO₂, por lo tanto, adoptar políticas y estrategias de mitigación son necesarias para neutralizar el exceso. El objetivo del Protocolo de Kioto de 1997, de reducir 5.2% las emisiones de GEI de todo el mundo, ha promovido una gran selección de tecnologías eficaces para la reducción de CO₂. (Brennan y Owende, 2010).

Este proyecto de investigación, se centra en alternativas de combustibles derivados de biomasa (Demirbas A., 2010; Poweell y Hill, 2010), lo que implica una solución que involucra la asimilación de CO₂ y la utilización de combustibles que causen un menor impacto en el ambiente. La idea de utilizar microalgas como fuente de combustible no es nueva, pero ahora se está adoptando considerablemente debido a la escalada de precios del petróleo y más significativamente por la preocupación creciente acerca del calentamiento global (Chisti, 2007).

Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto el potencial de las microalgas para la producción de una gran variedad de sustancias de interés químico, farmacéutico e industrial, además de sus aplicaciones en la alimentación animal y la depuración de aguas residuales. No obstante, la característica más importante del cultivo de microalgas es su versatilidad, posibilitando la integración de diferentes aplicaciones en

un único proceso tecnológico, lo que constituye una ventaja desde el punto de vista económico.

La aplicación de la tecnología de microalgas , podría lograrse a través del desarrollo de procesos de acuicultura que combine sus funciones para la mitigación de gases de efecto invernadero, el tratamiento de aguas residuales y la producción de biocombustibles, ofertando una estrategia integradora para una problemática compleja, que involucra diferentes factores que incluyen problemas ambientales, económicos y sociales.

El presente trabajo muestra el cultivo de 3 especies de agua dulce en un fotobioreactor con suministro de CO₂. Las especies estudiadas son 2 cepas comerciales *C. vulgaris* y *S. dimorphus* y la cepa autóctona *C. sorokiniana*, aislada de agua residual doméstica.

El estudio consta de 3 partes, cada especie se cultiva por separado operando bajo diferentes condiciones de cultivo y se realiza un análisis comparativo de la producción y composición bioquímica de la biomasa, al suministrar CO₂ al medio de cultivo.

HIPÓTESIS

Considerando que el Dióxido de Carbono es el factor fundamental en el proceso de la fotosíntesis, al incorporarlo a los cultivos de microalgas, estimulará el crecimiento celular y provocará modificaciones en el porcentaje de la composición bioquímica de las células.

OBJETIVO

Evaluar el efecto del CO₂ en la producción de biomasa y obtención de lípidos en las microalgas *C. sorokiniana*, *S. dimorphus* y *C. vulgaris*.

Objetivos específicos:

- ▶ Determinar las condiciones óptimas de crecimiento para la obtención de mayor producción de biomasa.

- ▶ Evaluación de los cultivos bajo diferentes concentraciones de CO₂.
 - Determinación de la concentración celular.
 - Evaluación de la cinética de crecimiento.
 - Determinación de la tasa de división celular.
 - Determinación de la productividad máxima.
 - Determinación de la tasa de fijación de dióxido de carbono.

- ▶ Evaluación de la composición bioquímica de la biomasa.
 - Determinación del porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos.

- ▶ Identificación de la cepa aislada de agua residual doméstica.
 - Extracción de ADN.
 - Análisis secuencial e identificación taxonómica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Cepas de Microalgas

1.1 Obtención de cepas

Las cepas de *Chlorella vulgaris* UTEX 265 y *Scenedesmus dimorphus* UTEX 1237 se obtuvieron de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Texas, EUA. Las cepas son seleccionadas de ensayos preliminares en base a la alta tasa de crecimiento que presentan, el porcentaje de su composición bioquímica y la capacidad de adaptarse a diversas condiciones y medios de cultivo frente otras especies.

La cepa de *Chlorella*, identificada como *sorokiniana* por el análisis de ADN ribosomal, fue aislada de agua residual doméstica de la planta tratadora Norte ubicada en la ciudad de Chihuahua, con el fin de cultivar una especie nativa tolerante al agua residual.

1.2 Identificación de *C. sorokiniana*

1.2.1 Extracción y purificación de ADN

En el aislamiento del ADN de la microalga autóctona *C. sorokiniana* y de *C. vulgaris* utilizada como control, se empleó el protocolo de Extracción Lyse´N´Trap Tissue DNA Isolation Kit (Biopolymer Isolation Technologies, LLC). El principio de funcionamiento es el lisado de la muestra > unión de ADN/RNA > lavado de membranas > elución de ADN > ADN purificado.

El protocolo para la extracción de ácidos nucleicos de la microalgas; Consistió en tomar muestras de cultivo en fase exponencial, centrifugar a 4000 rpm durante 20 min y desechar el sobrenadante. Agregar 50 mg

peso húmedo del pellet celular y 1 ml de solución de lisis dentro del tubo de lisis que contiene perlas de vidrios y se incuban por 15 minutos a 60°C. Homogenizar por medio de vortex por 10 minutos. Transferir las células lisadas a un tubo nuevo de 1.5 ml, centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto y transferir el sobrenadante a un tubo de 2 ml de capacidad donde se añaden 800 µL de solución de unión; se invierten los tubos al menos dos veces para mezclar los contenidos. En el cartucho con membrana de unión de ADN, cargar un máximo de 750 µL de la mezcla lisada y centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos. Descartar el fluido que atraviesa la membrana y se rearma el cartucho, repitiendo el último paso de carga de la mezcla lisada hasta procesar el volumen completo.

Añadir a la membrana que contiene el ADN aislado 500 µL de una solución de 70% etanol, con la finalidad de remover las sales unidas a la membrana y al ADN. Centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto eliminando el fluido que cruza la membrana en cada ocasión. Una vez lavada la membrana, centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto para remover cualquier residuo de la solución de etanol. Posteriormente transferir la membrana a un tubo nuevo de 1.7 ml, añadir 100 µL de solución de elución (10 mM Tris/5mM EDTA, pH 8.3) y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto. Recuperar la solución y cuantificar la concentración de ADN utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop 1000) a una absorbancia de 260 nm y se determina su pureza a 220 y 280 nm.

La integridad del ADN extraído se evaluó por medio de geles de agarosa al 1.5% y se conservaron a -20 °C en alícuotas hasta su posterior uso en PCR.

1.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación de ácidos nucleicos a partir de las muestras de microalgas se siguieron las instrucciones para condiciones de reacción de la enzima polimerasa Phusion HotStar HF (Fynnzymes, New Englan Biolabs). En el anexo 2 se detalla el procedimiento.

1.2.3 Oligonucleótidos usados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Un par de oligonucleótidos denominados NS1-NS2, amplifican en la región de rDNA nuclear y dos pares de oligonucleótidos CS1-CS2 y CS3-CS4 amplifican dentro de rDNA de cloroplasto. En la tabla 2.1. Se detallan las secuencias y tamaño aproximado del producto de la amplificación.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR en la identificación molecular de las muestras de microalgas.

Oligo-nucleótido	Fuente de rDNA	Secuencia de Oligonucleótido	Tamaño de Producto (pb)
NS1	SP Núcleo	5´-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3´	550
NS1	SP Núcleo	5´-GGCTGCTGGCACCCACCAGACTTGC-3´	
CS1	SP Cloroplasto	5´-CGGCTGATTAGCTTGTGG-3´	500
CS2	SP Cloroplasto	5´-GAGTGCTTTCGCCTTTGG-3´	
CS3	SP Cloroplasto	5´-AAGGCCAAAGCACTCTGC-3´	450-500
CS4	SP Cloroplasto	5´-TTCCTCCGGCTTATCAC-3´	

SP= Subunidad pequeña de rDN

1.2.4 Visualización de productos de PCR y su procesado para secuenciación.

Las reacciones de amplificación por PCR se visualizan por electroforesis en geles de agarosa 1.5% (50% Agarosa MBG y 50% Agarosa de bajo punto de fusión, para facilitar la recuperación de ADN) en una solución de electroforesis TAE (Tris- Ácido acético-EDTA).

El tamaño correcto de amplificación del producto de PCR del ADN genómico se corrobora con un estándar de ADN comercial Mass Ruler (Fermentas).

El ADN amplificado se recupera por escisión directa del gel y se extrae mediante filtración y centrifugación, se precipita por el método de alcohol- acetato de sodio y finalmente se resuspende en agua grado molecular.

El ADN purificado de cada muestra de microalgas se cuantifica en un espectrofotómetro (NanoDrop1000) a 260 nm, un mínimo de 1 µg de muestra es procesado en un secuenciador automatizado ABI 370 (Applied Biosystems Inc, Eton-Biosciences), usando los pares de oligonucleótidos empleados en el PCR como cebadores. En el Anexo 3. Se describe a detalle el protocolo realizado.

1.2.5 Análisis de Secuencias Obtenidas e Identificación Taxonómica

Los resultados de la secuenciación se analizan en forma de cromatogramas y se procesan en el programa Sequencher4.0 (GeneCodes), donde se evalúa la calidad de la señal, obtenida para cada hebra de ADN secuenciada. Un paso fundamental para evaluar la calidad de la señal es la remoción de las señales débiles que en su mayoría se encuentran a los extremos de las secuencias resultantes. Se hace una inspección visual, y si ambas hebras complementarias secuenciadas presentan anomalías de señal se eliminan.

Las secuencias editadas se someten a comparación en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov) con el programa BLAST-nucleotide. El programa compara las secuencias de nucleótidos de la base de datos de

secuencias y calcula la significancia estadística de las secuencias comparadas. Este programa permite inferir relaciones evolutivas entre secuencias ayudando asignar la especie a las muestras de microalgas analizadas. *Chlorella vulgaris* UTEX 265, se usó como control positivo en el análisis.

1.3 Purificación de *C. sorokiniana*

Los cultivos de *C. sorokiniana*, de la cepa ya aislada por el método de estriado en agar, son purificados para eliminar o diluir las bacterias presentes en la muestra mediante un proceso que involucra un lavado por centrifugación y el uso de antibiótico.

Todos los pasos que involucran el manejo de cultivos de microalgas se realizan en una campana de flujo laminar fase IIA (Air clean Systems model 300, PharmaSafe). El procedimiento de purificación, consiste en vaciar 20 ml de cultivo en fase exponencial en tubos estériles, centrifugar a 2000 rpm durante 50 segundos, eliminar el sobrenadante y resuspender en medio estéril, la operación se repite 4 veces. La centrifugación permite que las microalgas sedimenten y continúen suspendidas las células de menor peso como las bacterias y puedan ser desechadas en el sobrenadante. En el último lavado, se resuspenden en 2 ml de medio de cultivo estéril. Una pequeña porción se transfiere asépticamente con una pipeta Pasteur a una caja Petri con medio de cultivo Bristol-agar (15%, Sigma) con antibiótico cloranfenicol (500 µg/L, Sigma C0368). Los cultivos se incuban de 24 a 48 horas en condiciones para el crecimiento de la microalga, a una temperatura de 20°C e iluminación continua. Se transfieren asépticamente a medio de

cultivo estéril sin antibiótico y se observan los cultivos bajo el microscopio invertido para verificar si no existen indicios de crecimiento bacteriano.

1.4 Mantenimiento de las cepas

Las cepas se mantienen en una incubadora (Torres Pines Scientific, ECHO Therm in 40), a una temperatura constante de 18°C e iluminación continua. Dentro de tubos de ensayo de 20 ml tapados con algodón estéril, rotulados con el nombre del organismo y fecha de inoculación.

2 Cultivo de Microalgas

2.1 Cultivo inicial

La inoculación de las microalgas se realiza bajo el ambiente estéril de una campana de flujo laminar clase IIA. Una muestra de la cepa se transfiere asépticamente con una asa metálica a tubos de ensayo de 50 cc de capacidad con 10 ml de medio de cultivo Bristol líquido o en medio sólido para preservar (15% agar, Sigma). La boca de estos recipientes se pasa cerca de la flama del mechero para eliminar microorganismos que pudieran contaminar el cultivo. Los tubos se tapan con un algodón estéril y se rotulan con nombre de la especie, fecha de inoculación y medio de cultivo.

Se mantienen con iluminación continua, en una incubadora (Torres Pines Scientific, ECHO Therm in 40) a una temperatura de 18°C, se realiza

una agitación manual en forma periódica y suavemente. Las inoculaciones periódicas, se realizan por triplicado y dependiendo del crecimiento de la cepa, aproximadamente entre 7-9 días.

2.2 Modificación del medio de cultivo

En base a resultados de productividad alcanzada en cultivos de *C. vulgaris*, se modificó el medio de cultivo Bristol, incrementando la concentración de NaNO_3 en un orden de 1.3 que en la concentración normal, y con la adición de 0.025 g L^{-1} de $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para favorecer el crecimiento celular.

2.3 Medio de Cultivo

C. vulgaris y *S. dimorphus* se cultivaron en medio de cultivo Bristol-modificado, preparado por los componentes por Litro de agua destilada que se muestran en la tabla 3. Todos los compuestos grado reactivo.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo Bristol-modificado.

Compuesto	Cantidad / L
NaNO ₃ (Fisher BP360-500)	0.45g
CaCl ₂ - 2H ₂ O (Sigma C-3881)	0.025g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma 230391)	0.075g
K ₂ HPO ₄ (Sigma P 3786)	0.075g
KH ₂ PO ₄ (Sigma P 0662)	0.0175g
FeSO ₄ -7H ₂ O (Sigma 38047)	0.025g
Na ₂ EDTA - 2H ₂ O (Sigma ED255)	1mg
Solución de metales	1 ml
Vitamina B ₁₂ (Sigma V-6629)	1 ml
Biotina (Sigma B-4639)	1 ml
Tiamina (Sigma T-1270)	1 ml

Para el cultivo de la cepa *C. sorokiniana*, se utilizó Nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, compuesto presente en aguas residuales. El medio fue preparado con la adición por litro de los compuestos que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Composición de medio de Agua residual Sintética

Compuesto	Cantidad / L
NH ₄ Cl	0.535 g
CaCl ₂ - 2H ₂ O	0.05 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.15 g
KH ₂ PO ₄	0.0492 g
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.025 g
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	2 mg
Solución de metales traza	1 ml
Vitamina B ₁₂	1 ml
Biotina	1 ml
Tiamina	1 ml

La solución de metales traza se preparó de acuerdo a la receta de Hutner's Trace elements (Hutner et al., 1950). La solución stock de 1 Litro se compone de 50g de Na₂EDTA·2H₂O (Sigma ED255), 22g de ZnSO₄·7H₂O (Sigma Z 0251), 11.4g de H₃BO₃ (Sigma B0394), 5.6g de MnCl₂ - 4H₂O (M3634), 1.61g de CoCl₂ - 6H₂O (C2644), 1.57 mg de CuSO₄ - 5H₂O (Sigma C2284), 1.10 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O (sigma M1019), 4.99g de FeSO₄ -7H₂O (Sigma 38047).

2.4 Enriquecimiento celular

En este proceso se brinda el ambiente adecuado para el crecimiento y reproducción de las microalgas. A través de diluciones 1:10 se realiza el traspaso volumétrico secuencial de los cultivos, realizando 3 réplicas como respaldo.

La transferencia de inóculos se debe hacer evitando que el cultivo sedimentado pase al nuevo medio y se realiza una vez que los cultivos se encuentran en fase de crecimiento exponencial, momento en que las microalgas se han adaptado al medio y comienzan a multiplicarse.

El procedimiento consiste en tomar 1 ml del cultivo inicial y transferir a un tubo de ensaye que contiene 9 ml de medio de cultivo estéril. Trasladar los 10 ml de inóculo a 90 ml de medio de cultivo en un matraz Erlenmeyer de 200 cc de capacidad. A partir de los 200 ml de cultivo, inocular 100 ml en 900 ml de medio de cultivo en un matraz Erlenmeyer de capacidad de dos litros. En cada traspaso, se deben tapar los recipientes con algodón estéril y mantener a una temperatura de 25°C bajo una iluminación continua, además de realizar tres veces al día una agitación manual a los cultivos.

3 Fotobioreactor

3.1 Descripción del Fotobioreactor

Las microalgas se cultivaron en un fermentador modelo Bio 2000 marca New Brunswick Scientific, que consta de un módulo de control conectado a un vaso de vidrio de 45 cm de altura y 23 cm de diámetro. El fermentador está equipado con control de temperatura, pH, agitación y Oxígeno Disuelto, con las especificaciones que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Especificaciones del Fermentador Bio 2000.

Fermentador Bio 2000		
Volumen del vaso	Total	6.7 L
Volumen de trabajo	Min.	2.0 L
	Max.	5.0 L
Peso	Montado	39 kg
	Neto	29 kg
Dimensiones	Altura total	93.4 cm
	Ancho	48.3 cm
	Largo	33.4 cm

El fermentador incorpora un potenciómetro (Mettler Toledo) y un electrodo de oxígeno disuelto (Mettler Toledo). Posee un sistema de control de temperatura a base de un sensor (platino RTD) que controla a una almohadilla eléctrica calentadora situada en la base del fermentador, y a un serpentín de enfriamiento de acero inoxidable dentro del vaso.

La agitación de los cultivos se efectúa por medio de un motor que acciona dos aspas situadas en el eje central del vaso. Un deflector dentro de las paredes del vaso favorece el mezclado, homogenización del medio y la transferencia de calor.

El fermentador es iluminado por medio de dos bases con 4 lámparas fluorescentes de luz blanca de 20 W cada una, colocadas verticalmente a los costados del reactor.

En las figuras 1 y 2 se muestran los diagramas de los componentes del vaso del fermentador.

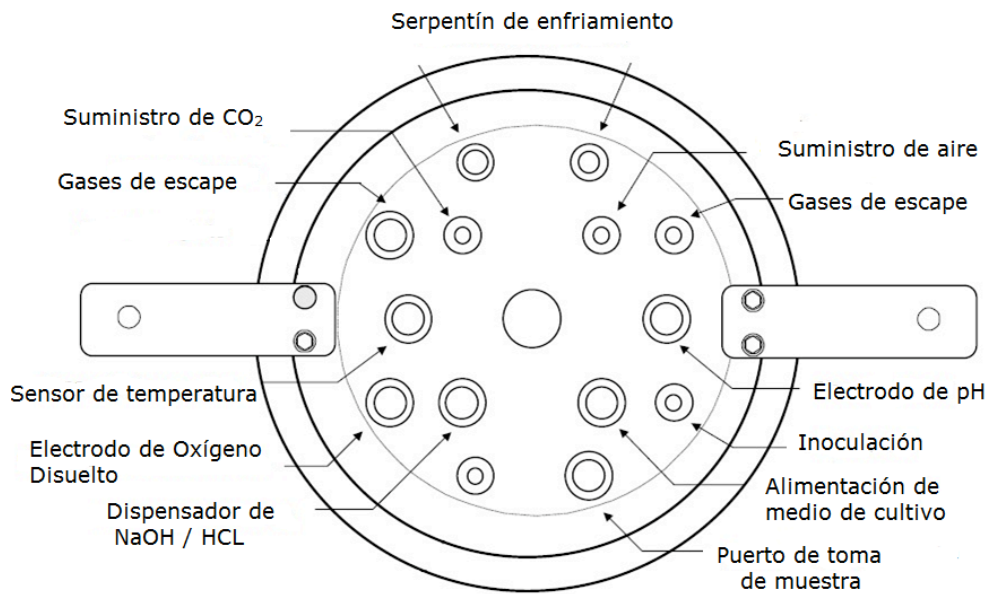


Figura 1. Diagrama de la cubierta del vaso del fermentador. Se muestran los puertos de entrada y salida.

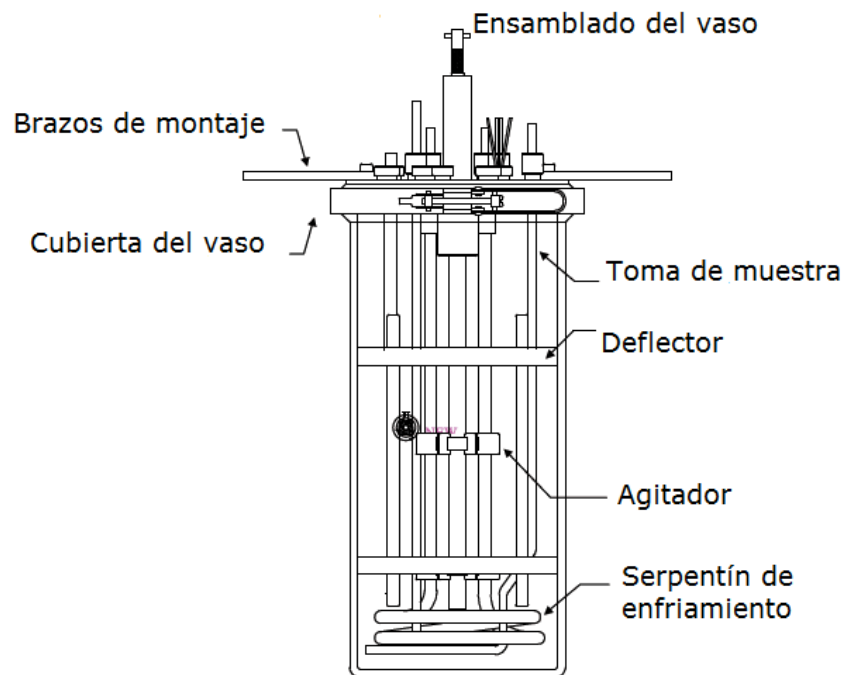


Figura 2. Esquema de componentes del vaso del fermentador. Muestra la ubicación de componentes importantes en el ensamblado.

3.2 Alimentación de medio de cultivo

Para abastecer el medio de cultivo estéril, un contenedor de plástico autoclavable con capacidad de 10 L Litros (2250, Nalgene), es conectado al fotobioreactor por medio de una línea de tubería de silicón de 6 mm (Watson Marlow) y una bomba peristáltica (313S, Watson Marlow).

3.3 Suministro de gases

El sistema de aireación, consta de una bomba como fuente de aire con capacidad de 1 L/min (whisper 60, Marca Tetra), un tanque de CO₂ (recargable de 35 kg) como fuente del suministro, línea de tubería de silicón (Watson Marlow), 2 filtros de aire en las entradas (0.2 µm, Whatman Pall), 2 difusores de aire con forma cilíndrica de 3 cm situados en el fondo del reactor y dos flujómetros con válvula micrométrica (Gilmont instruments).

El escape de gases del biorreactor, se facilita por medio de una manguera enrollada en forma de espiral que funge como condensador; en el extremo cuenta con un filtro de aire de 0.2 µm (Whatman Pall).

3.4 Inyección automática de CO₂

El biorreactor cuenta con la función para controlar el pH, que opera cuando se desea cultivar a un pH constante. El sistema de control

consta de dos dispensadores asépticos, uno de ácido (HCl) y uno de solución alcali (NaOH), línea de tubería flexible y una bomba peristáltica.

Para lograr un sistema de inyección automática de CO₂, la línea de tubería de silicón del puerto de entrada del dispensador se adapta a la bomba peristáltica del módulo de control, y se conecta al regulador del tanque de CO₂. De esta forma, sustituyendo el suministro de HCl por el de CO₂, el módulo controla la acidificación del cultivo mediante el suministro de CO₂.

3.5 Componentes del fotobioreactor

En la figura 3 se muestran los componentes principales del sistema de cultivo del fotobioreactor.

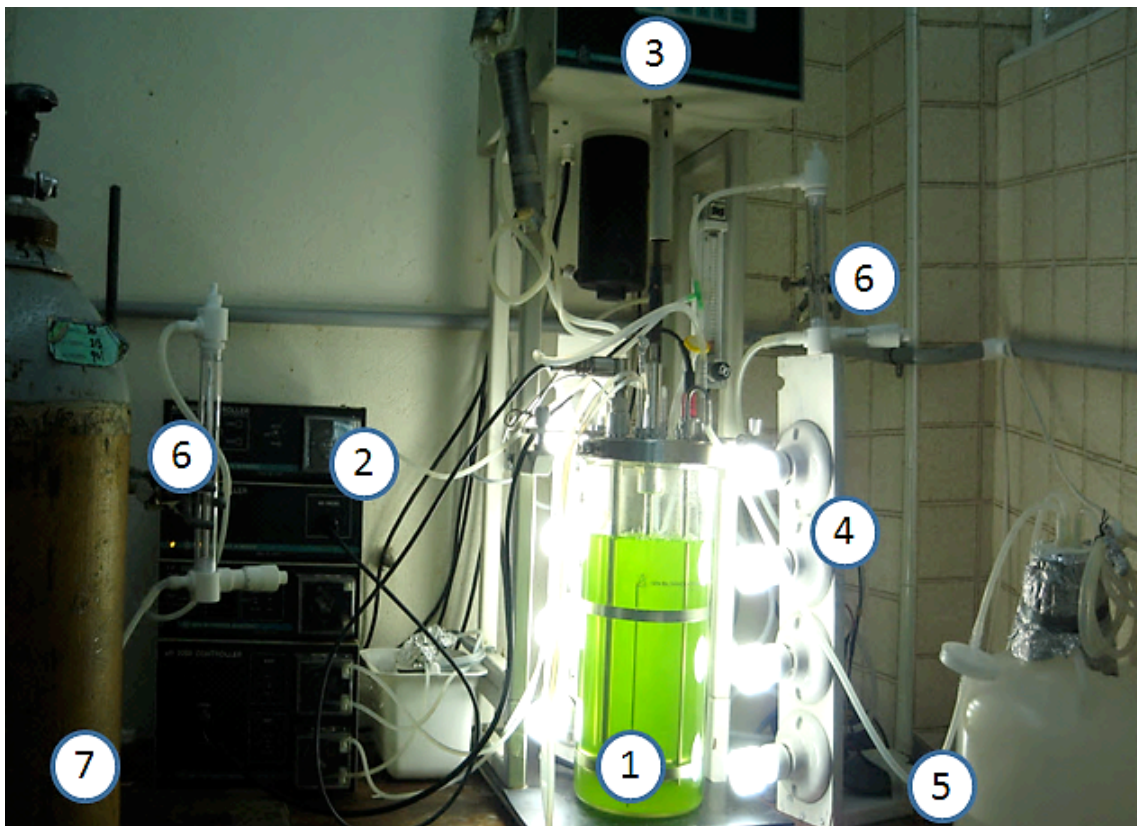


Figura 3. Sistema de fotobioreactor. Muestra los componentes del sistema de cultivo.

Componentes

1. Vaso
2. Módulo de control
3. Panel de control
4. Iluminación
5. Alimentación de medio de cultivo
6. Flujómetros micrométricos para el control de aire y CO₂
7. Tanque de suministro de CO₂

3.5.1.1 Limpieza de material

El material se conduce por un "tren de lavado" que consiste en 3 lavados sucesivos con detergente (alconox), seguido de una solución de cloro al 10% y finalizando con una solución de HCL diluido 1:60. Con un tiempo de lavado de 10 minutos y enjuagues con agua corriente entre cada uno. Por último se enjuaga todo el material con agua destilada.

3.6 Ensamblado y esterilización del biorreactor

Procedimiento:

- Ensamblar las partes del vaso, calibrar el potenciómetro.
- Preparar las soluciones de NaOH (5N) y HCL (1.2 M) en recipientes autoclavables y conectar al puerto de dispensador de soluciones.
- Preparar el medio de cultivo.

El autoclavado puede causar precipitación en el medio. Para evitarlo se aplican los elementos traza, FeSO_4 , las vitaminas y las fuentes de Nitrógeno y Fósforo previamente esterilizados por filtración en el momento de la inoculación.

- Verter 3500 ml de medio de cultivo en el vaso del fermentador, insertar los sensores de pH y oxígeno disuelto. Cerrar el fermentador, asegurando una salida correcta de presión.
- Colocar en autoclave (Marketforge Sterilmatic) a 121°C por 25 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.
- Ensamblar el vaso en la base del fermentador y realizar las conexiones al módulo de control, así como a las fuentes de suministro de gases. Insertar y calibrar el sensor de Oxígeno Disuelto.
- Esterilizar 4 litros de medio de cultivo en el contenedor de plástico, en un ambiente estéril conectar el contenedor al puerto de alimentación de cultivo del biorreactor.
- Diluir en agua estéril los compuestos del medio de cultivo que no se esterilizaron en autoclave y filtrar a través de membrana de PDVD poro $0.2 \mu\text{m}$ (Millipore)

4 Cultivo de Microalgas en Fotobioreactor

4.1 Acondicionamiento del inóculo

Los matraces con 1 Litro de cultivo son agitados por medio de aire filtrado a $2 \mu\text{m}$ (Millipore).

Una fase *lag* prolongada puede ser debida a un periodo fisiológico de adaptación a las nuevas condiciones del cultivo. Para reducir este

proceso, los inóculos de cultivos con inyección de CO₂ se acondicionan suministrando una concentración del 2% de CO₂ durante 5 minutos cada 8 horas, tres días previa a la inoculación.

4.2 Inoculación

La inoculación se debe realizar bajo una atmosfera estéril. Es necesario limpiar la superficie de trabajo con cloro al 10%, evitar corrientes de aire y trabajar en presencia de dos mecheros de gas (Fisher).

Ajustar las condiciones de agitación a 50 rpm, encender la iluminación, ajustar el pH a 7 y regular la temperatura a 25°C. Fijar el suministro de aire a un flujo continuo de 500 ml por minuto.

Añadir al medio de cultivo los compuestos que fueron filtrados para su esterilización. Introducir mediante la bomba peristáltica el inóculo en fase de crecimiento exponencial. Al paso de 4 horas de la inoculación, incrementar la agitación a 100 rpm.

4.3 Modo de cultivo discontinuo y semicontinuo

El modo discontinuo (batch) o cultivo por lote, son cultivos intermitentes que se implementan de una sola vez y son cosechados completamente después de que la producción microalgal alcance el nivel deseado. En el estudio experimental, la biomasa se cosecha en la fase estacionaria (temprana).

El modo de cultivo semicontinuo, debe contar con una línea de entrada o alimentación. En los cultivos se debe remover una cantidad de cultivo y renovar el volumen por medio de cultivo fresco. En el ensayo experimental, operando en modo semicontinuo, cada 24 horas un litro de cultivo se reemplaza por 1 Litro de medio de cultivo fresco. El cultivo se utiliza para la determinación de lípidos, carbohidratos y proteínas.

4.4 Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron bajo diferentes concentraciones de CO₂, con 3 distintas técnicas de suministro del gas.

De acuerdo a análisis preliminares de cultivos de *C. vulgaris* en el fotobioreactor, se determinaron las condiciones de cultivo que promovieron la mayor concentración de biomasa en el menor tiempo. Estos parámetros se establecieron como variables independientes durante el desarrollo de los cultivos.

Todos los ensayos se realizaron bajo un régimen isotérmico de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ bajo iluminación continua (24/0) y agitación constante de 100 rpm. El pH y Oxígeno disuelto (OD) en el medio son monitoreados constantemente. La concentración celular es determinada cada 24 horas.

4.5 Cultivo de *Chlorella vulgaris*

Los cultivos se operan en modo discontinuo en 4 Litros de medio de cultivo Bristol-modificado con un tiempo de retención de 7 días, se mantienen bajo aireación continua a un flujo de 600 ml de aire/min. Los

cultivos se muestrean cada 48 horas para determinar contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas.

El ensayo consta de dos tratamientos:

El primer tratamiento se realiza bajo el método de "alimentación de carbono" que consiste en adicionar CO₂ a la aireación del cultivo, burbujeando lentamente el gas de manera experimental hasta que el pH del medio se ajuste a 7. La inyección de CO₂ se realiza cada 24 horas, se cierra el suministro y se continúa el cultivo bajo las mismas condiciones.

En el segundo tratamiento realizado como control, la aireación del cultivo se realiza con un flujo de aire puro. Cada 24 horas el pH del medio se ajusta a 7 por medio de la adición de HCl y se continúa el crecimiento normal.

4.6 Cultivo de *Scenedesmus dimorphus*

El estudio experimental, consta de dos tratamientos de 120 horas de incubación en medio de cultivo Bristol modificado cada uno. Los cultivos se realizan en modo de cultivo semicontinuo y se inician con una densidad celular de 1×10^6 células ml⁻¹.

En el primer tratamiento, como fuente de carbono inorgánico en el cultivo, se burbujea aire puro que contiene aproximadamente 0.033% de CO₂, a un flujo intermitente de 500 ml min⁻¹.

En el segundo tratamiento, se suministra una mezcla de aire y CO₂ con un flujo de 500 ml/min. Mediante 2 flujómetros, se ajusta la entrada de gases para lograr una concentración de CO₂ de 2.5 % las primeras 24

horas e ir incrementando a 5.2% y 11 % al paso de 48 horas de incubación.

4.7 Cultivo de *Chlorella sorokiniana*

El ensayo experimental, se divide en 3 tratamientos de 120 horas de incubación cada uno en medio sintético de agua residual. Se opera en modo de cultivo semicontinuo, con aireación constante por un flujo de 500 ml de aire puro por minuto e inyección automática de CO₂. El suministro de CO₂ se inyecta directamente en el medio de cultivo cuando detecta una caída de pH.

Tratamiento 1. El cultivo se lleva a cabo a un pH de 7 y se mantiene constante suministrando automáticamente CO₂ al medio de cultivo.

Tratamiento 2. Se cultivan las microalgas a un pH constante de 6.3 mediante la inyección automática de CO₂ al medio.

Tratamiento 3. No hay suministro de CO₂ adicional. El pH del medio de cultivo no es controlado, la aireación se realiza únicamente con el suministro de aire puro.

5 Análisis de los cultivos

5.1 Crecimiento celular

El crecimiento de los cultivos, expresado como el incremento del número de células por mililitro, se determina por el método de recuento celular. Se tomaron muestras diarias del cultivo con una distribución homogénea de células y se cuentan a través de un microscopio

(Olympus BH-2) y un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con rejilla de Neubauer (Bright-Line, Hsusser Scientific).

5.2 Densidad óptica

La concentración celular se estima de manera indirecta utilizando la densidad óptica. Que consiste en colocar 1 ml de cultivo en una celda de cuarzo, agitar para distribuir homogéneamente las células y medir en un espectrofotómetro (DR-200, HACH) a una longitud de onda de 650 nm. La biomasa se puede subestimar, si se encuentra fuera del rango lineal, por lo que, cuando la densidad óptica es superior a 1.0, la muestra se diluye para conseguir una absorbancia en el rango 0.1-1.0.

5.3 Cinética de crecimiento

Las condiciones ambientales cambian con la edad del cultivo, lo cual modifica la velocidad del crecimiento poblacional. El crecimiento celular se puede modelar por medio de la curva de crecimiento, que permite reconocer las fases de crecimiento y describir la forma en la que cambia la concentración celular o de biomasa durante el desarrollo del cultivo de microalgas. La curva de crecimiento de cada microalga, se obtuvo graficando los datos de la concentración celular contra el tiempo sucesivo.

5.4 Peso seco total

El peso seco total de la biomasa se determina de la siguiente manera: Un volumen de 25 ml de cultivo, con una concentración celular específica, se filtra a través de una membrana de microfibra de vidrio de peso conocido (GF/F 25mm, Whatman). Las muestras se lavan con agua destilada y se colocan en sobres de papel aluminio entreabiertos, se secan en una mufla a una temperatura de 60°C por lo menos 12 horas y se enfrían en un desecador por 1.5 horas. Los filtros se pesan en una balanza analítica de 5 dígitos. Se debe repetir esta operación hasta obtener peso constante. Por diferencia entre el peso inicial del filtro y el peso del filtro con la muestra, dividida entre el volumen de cultivo filtrado se obtiene, el peso seco total presente en un cultivo.

La relación entre la densidad óptica y el peso seco de las células, se estableció por regresión lineal. Obteniendo para cada especie la ecuación de la curva ($R^2 > 0.99$)

Por lo tanto, la densidad óptica es útil para predecir con precisión la concentración y rapidez la concentración de biomasa.

5.5 Tasa de crecimiento

Para la determinación de la concentración celular registrada entre el inicio y final en un intervalo de tiempo, se utiliza la ecuación de crecimiento específico:

$$\mu_e = \ln(x_2 - x_1) / (t_2 - t_1)$$

Donde x_2 y x_1 son la concentración celular determinada en el tiempo t_2 y t_1

Para determinar el inicio y final de cada fase de crecimiento se grafica contra el tiempo la suma progresiva de las tasas de crecimiento diario ($\square\mu$). Cada cambio en la pendiente de la curva de dispersión, indica una variación de la velocidad de duplicación de la microalga.

5.6 Tasa de consumo de Dióxido de carbono

La eficiencia de eliminación de dióxido de carbono puede ser evaluada por la tasa de consumo de dióxido de carbono (PCO_2) (Ho *et al.*, 2010) de acuerdo a la ecuación:

$$P_{(CO_2)} = P_{(total)} * 1.88$$

Donde $P_{(total)}$ indica la productividad de biomasa total del cultivo
 $P = \Delta X (\Delta T)^{-1}$

5.7 Obtención de Biomasa

El cultivo se cosecha y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4° C (centrifuga refrigerada, Sorvall RC5B Plus), se desecha el sobrenadante y la biomasa se lava con agua destilada; esta operación se repite dos veces. Mediante liofilización (liofilizadora Lyph-lock, LABCONCO), se elimina la humedad de la biomasa obtenida. La biomasa seca se coloca en tubos (falcon) etiquetados con fecha de cultivo, y se preservan a una temperatura de -4°C hasta el momento de su análisis.

5.8 Composición Bioquímica de la biomasa

5.8.1 Rojo Nilo

Para una rápida cuantificación relativa de lípidos neutros presente en las microalgas, se utiliza la tinción de rojo Nilo. El procedimiento es el siguiente: centrifugar la cantidad de cultivo que sea necesario para formar pellets de 1×10^6 células, resuspender en 1 ml de buffer de fosfatos y agregar 6.25 μL de solución de Rojo Nilo. Agitar vigorosamente la mezcla por medio de vortex y colocar en la oscuridad durante 30 min, centrifugar para descartar el sobrenadante y resuspender el pellet de las células teñidas en 1ml de buffer de fosfatos. Realizar las mediciones fluorométricas a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 576 nm en un Spectrofotómetro (ND-100, Nano Drop. Acoplado con detector de fluorescencia MODULUS, modelo Blue # 9200-040 Turner BioSystems).

5.8.2 Extracción y cuantificación de lípidos

La extracción de lípidos totales se realiza por el método de Bligh and Dyer (1959), adaptado para la extracción de lípidos de microalgas. El proceso consiste en: depositar en un tubo de vidrio (tubo 1) un peso conocido de biomasa seca, adicionar 3 ml de una mezcla de solventes cloroformo: metanol (1:2), sonicar (disruptor ultrasónico de células XL, Microson) durante 15 min. Para favorecer la extracción de los lípidos se incuban protegidos de la luz durante 24 horas a 4°C. Sonicar por 15 min y centrifugar a 5000 rpm en centrífuga Refrigerada (Sorvall RC5B Plus) por 20 min a 5°C, recuperar el extracto ácido en un tubo limpio (tubo 2), agregar 1.5 ml de la mezcla cloroformo: metanol y centrifugar

nuevamente, recuperando el extracto. Agregar 2 ml de agua destilada y agitar por medio de vortex. Eliminar el exceso de agua y centrifugar por 10 minutos, separar la fase inferior formada de cloroformo-lípido y colocarla en un tercer tubo previamente llevado a peso constante. La fase cloroformo:lípido se seca mediante nitrógeno gaseoso, bajo campana de extracción, se coloca en un desecador y se realiza la cuantificación de lípidos totales mediante gravimetría.

% Lípidos= 100 (Peso del tubo con lípidos- peso del tubo vacío)/ peso de la muestra.

5.8.3 Determinación de proteínas

El análisis de proteínas se realiza por el método microkjeldah, empleando 6.25 como factor en la conversión del contenido proteico de las microalgas. Procedimiento:

La reacción de digestión consiste en, pesar la muestra de microalgas liofilizadas, colocar en un matraz de fondo esférico, añadir una pequeña cantidad de $\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$, agregar 0.5 g de K_2SO_4 y 2ml de H_2SO_4 . Someter la muestra a digestión en el digestor (LABCONCO), bajo una campana de extracción, usando baja temperatura al inicio y aumentando la temperatura a medida que procede la digestión. Los matraces se rotan continuamente para asegurar que se digiera toda la muestra. La digestión termina cuando el color de la muestra se torna azul-verde claro, se deja enfriar y se afora a 10 ml con agua destilada.

Reacción de neutralización y destilación. En el destilador (Adams & Chittenden Scientific glass), se añade la muestra y se enjuaga el recipiente con 5ml de H_2O destilada. Un matraz Erlenmeyer con 10 ml

de H_3BO_3 saturado al 5% se coloca en la salida de destilación. Se añade lentamente solución de NaOH (40 %) en la cámara de ebullición. La mezcla digerida se debe tornar oscura. El destilado esta listo cuando se torna color verde, se limpia el destilador enjuagando varias veces con agua destilada. La operación se repite 4 veces.

Reacción de titulación. La muestra se titula con una solución 0.1N de HCl. Un color violeta indica el punto final de la titulación. Se compara el color con el del blanco utilizado. Cada equivalente del HCl usado corresponde a un equivalente de N en la muestra original.

Moles de HCl = Moles de NH_3 = Moles de N en la muestra.

5.8.4 Determinación de carbohidratos

Los Carbohidratos totales se determinan por espectrofotometría utilizando el método de fenol-ácido sulfúrico Dubois et. al. Se realiza una curva de calibración de carbohidratos utilizando como estándar glucosa anhidra. En la grafica 4 se muestra un gradiente de concentración de glucosa como la variable dependiente contra el valor de la absorbancia a una longitud de onda de 485 nm. Se ajusta por mínimos cuadrados a una ecuación lineal obteniendo la ecuación de la recta: $y = 61.66x + 0.0608$ ($R^2 = 0.9991$)

A partir de la ecuación obtenida, la concentración de carbohidratos se calcula como: **Carbohidratos = $m \cdot A_{485}$** . La cuantificación de la concentración de carbohidratos en una muestra de microalgas, consiste en pesar 5 mg de biomasa liofilizada, agregar 1 ml de H_2SO_4 1M, sonicar durante 5 minutos, agregar 4 ml de H_2SO_4 1M, tapar los tubos con papel aluminio y colocar en un termo-baño a 100°C por 15 min. Se

retiran los tubos y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Para la separación del extracto ácido, se centrifugan por 15 min a 4000 rpm a 10°C, y con una pipeta Pasteur se toman 100 µL ml del extracto y se mezclan con 1 ml de fenol al 5%. Se deja reposar 40 minutos, y se agregan lentamente 5 ml de H₂SO₄ concentrado. Se enfria a temperatura ambiente y se lee a 485 nm. La cuantificación de carbohidratos se calculó mediante la ecuación.

$$\% \text{ carbohidratos} = (((m * A_{485}) / V_m * V_e) / P_s * 100$$

Dónde: V_m es el volumen de la muestra, V_e el volumen del extracto ácido y P_s el peso seco.

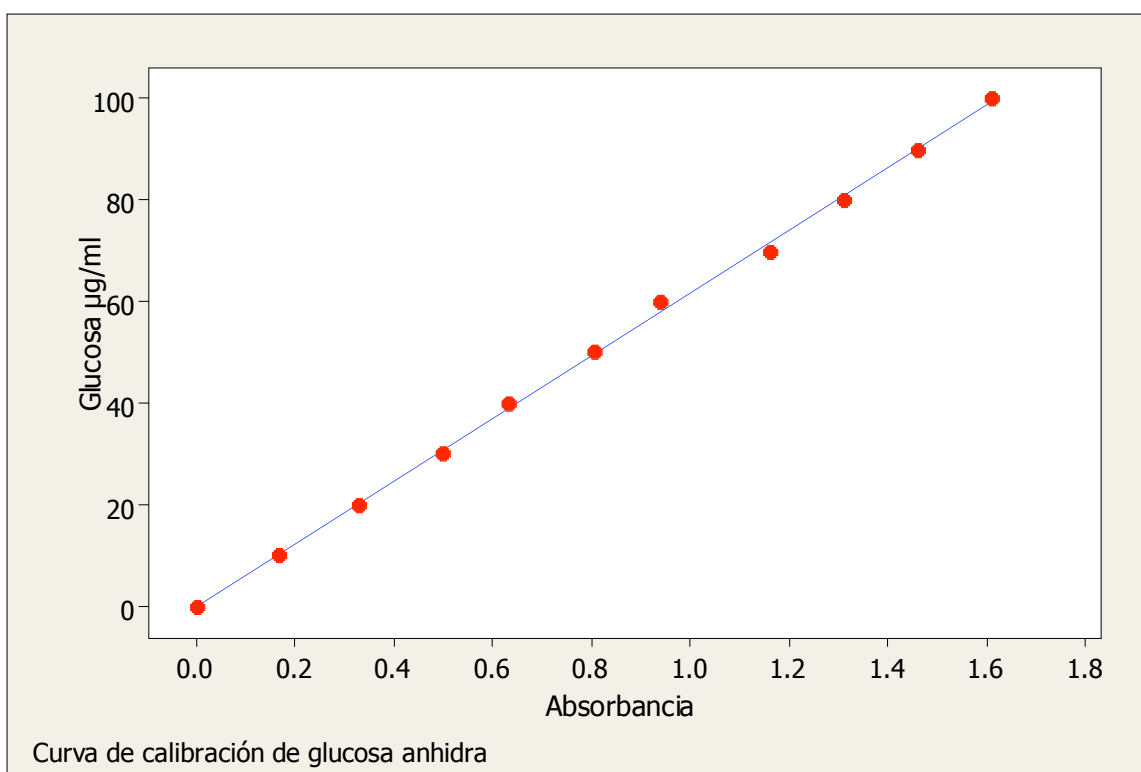


Figura 4. Curva de calibración de carbohidratos utilizando la concentración de glucosa como variable dependiente a una Absorbancia de 485 nm.

6 Análisis estadístico

Las variables de respuesta analizadas fueron: la producción de biomasa y el porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos acumulados durante los cultivos.

Los resultados se expresan como la media \pm SE (error estándar) de dos réplicas.

El análisis de regresión y el método de mínimos cuadrados se utilizaron para describir la relación entre las variables independientes y la variable dependiente.

Se aplicaron las pruebas de Anderson- Darling y Kolmogorov - Smirnov para examinar si los datos siguen una distribución normal.

El análisis de varianza (ANOVA) fue utilizado para evaluar las diferencias entre los tratamientos. Nivel de confianza de 95%, por lo que un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los métodos de Fisher y Tukey se utilizaron en la comparación de medias de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1 *Chlorella vulgaris*

La microalga *C. vulgaris* fue cultivada en modo discontinuo durante 7 días, con una concentración inicial promedio de 1×10^6 células mL^{-1} . Para evaluar el efecto del CO_2 en el crecimiento celular, un tratamiento es utilizado como control suministrando aire puro al cultivo. Un segundo tratamiento es conducido bajo el método de alimentación de CO_2 .

1.1 Crecimiento celular

La máxima concentración celular (42.17×10^6 células mL^{-1}) de *C. vulgaris* en el tratamiento con CO_2 aumentó 45.21 % más que la obtenida en el tratamiento con aire (29.04×10^6). El análisis de varianza (ANOVA) unidireccional realizado por día y la aplicación de los estadísticos de comparación de medias de Fisher y Tukey, indican que existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la concentración celular de los dos tratamientos a partir del primer día de cultivo hasta el día 7.

El efecto del CO_2 en el crecimiento celular se representa por la curva de crecimiento (figura 5) y la curva de crecimiento específico (Figura 6), donde el cambio en la pendiente de la curva indica el cambio en la tasa de división celular. Como se muestran en las curvas, no se presenta una fase de adaptación en los dos tratamientos. En el cultivo de *C. vulgaris* con CO_2 se detecta la fase de crecimiento exponencial hasta el día 2 donde alcanza la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) de 2.15 día^{-1} y la productividad máxima (P_{xmax}) de $0.43 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$; en el tratamiento con aire el crecimiento exponencial se presenta hasta el día 3 con una μ_{max} de 1.75 día^{-1} y P_{xmax} de $0.32 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Debido a la

disminución en la tasa de crecimiento (día dos), se observa la fase de desaceleración, que se extiende hasta el día 4 en el cultivo suministrado con CO₂ y al día 3 en el tratamiento con aire, el inicio de la fase estacionaria; en el tratamiento con CO₂ se observa a partir del día 6 y en el tratamiento con aire en el día 5.

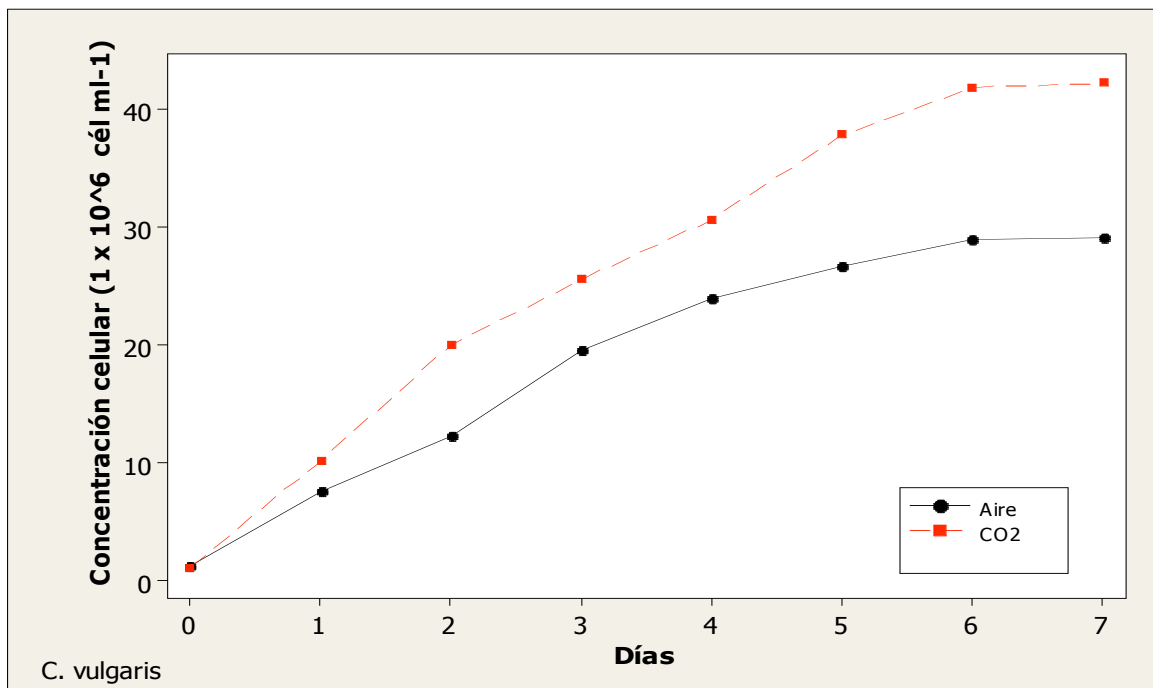


Figura 5. Curva de crecimiento de *C. vulgaris* crecida en diferente condición de cultivo: ● aire y ■ CO₂ adicional.

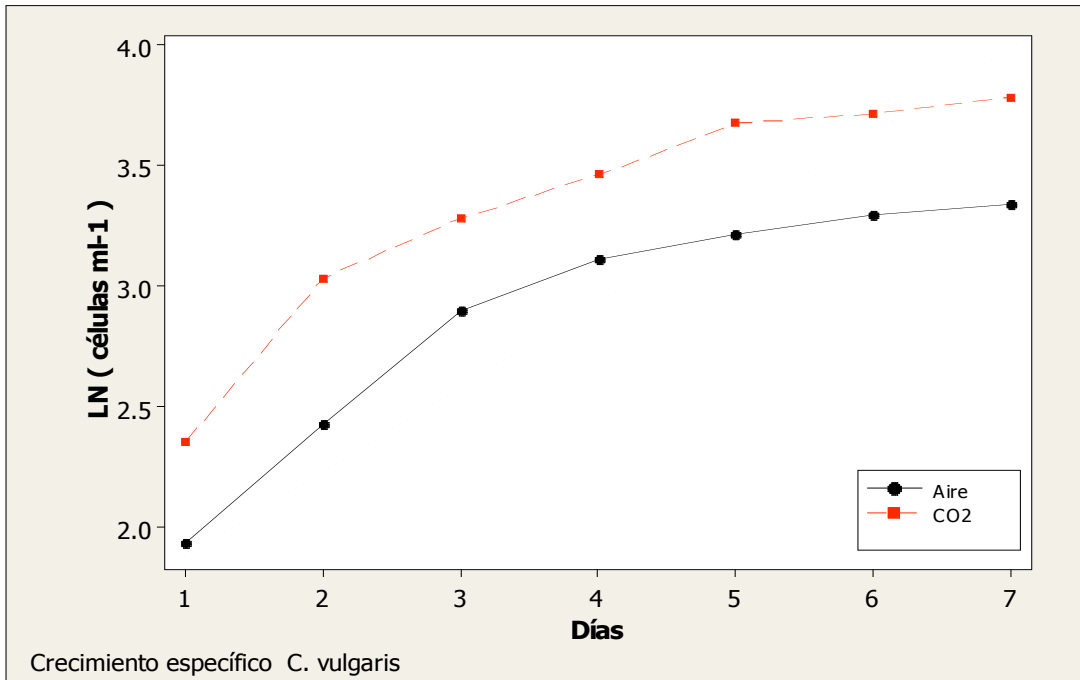


Figura 6. Curva de crecimiento específico de *C. vulgaris* crecida en diferente condición de cultivo: ● aire y ■ CO₂ adicional.

En el tratamiento con CO₂, la tasa máxima de crecimiento (2.15 día⁻¹) se incrementó un 23% y la productividad máxima (0.43 g L⁻¹ día⁻¹) se incrementó un 35 % respecto al cultivo con aire (Tabla 6)

1.1.1 Determinación de biomasa

La concentración celular expresada en gL⁻¹ se evaluó mediante la determinación de peso seco. Se estableció, por medio de regresión lineal, la relación entre la densidad óptica del cultivo y el peso seco de la biomasa, obteniendo la ecuación:

$$y = 0.4455x + 0.0108 \quad R^2 = 0.9958$$

Donde Y: Concentración de biomasa (gL⁻¹) y X: Densidad óptica (A 680nm)

La más alta concentración de biomasa alcanzada por *C. vulgaris* en el tratamiento con CO₂, aumentó un 45.21 % más que la obtenida en el tratamiento con aire (tabla 6). Esta concentración máxima se produjo en el sexto día de cultivo en los dos tratamientos.

Tabla 6. Efecto del CO₂ en el crecimiento celular de *C. vulgaris*.

	Tratamiento Control- aire	Tratamiento con CO ₂
Concentración de biomasa promedio	0.751 (g L ⁻¹)	1.05 (g L ⁻¹)
Máxima concentración de biomasa	1.303 (g L ⁻¹)	1.887 (g L ⁻¹)
Tasa máxima de crecimiento (μ_x)	1.75 día ⁻¹	2.15 día ⁻¹
Productividad máxima (Pmax)	0.32 g L ⁻¹ día ⁻¹ .	0.43 g L ⁻¹ día ⁻¹

En un estudio con *C. vulgaris*, usando un biorreactor suministrado con 5% de CO₂, Sidney *et al.*, (2010) encontraron una máxima concentración celular de 1.9 g L⁻¹ en el día 15, un máximo crecimiento específico (μ_{max}) de 0.29 d⁻¹ y una (P_{xmax}) de 0.31 g L⁻¹ día⁻¹. Morais y Costa (2007) obtuvieron resultados similares de μ_{max} (0.31 d⁻¹) y Pmax (0.14 g L⁻¹ día⁻¹) en el cultivo de *C. vulgaris* en reactores tubulares verticales suplementado 6% de CO₂.

En el presente ensayo experimental, los valores de μ_{max} (2.15 día⁻¹) y P_{xmax} (0.43 g L⁻¹ día⁻¹) son superiores que los reportados, incluso con el tratamiento control suministrado con aire. Por otra parte, aunque se

obtuvo una concentración de biomasa similar (1.88 g L^{-1}), el tiempo en que es alcanzada es de 6 días, comparado con los 15 días reportados.

Tal divergencia entre resultados, puede atribuirse al diseño general del ensayo, que comprende optimizaciones diferentes en el tipo de medio de cultivo, como en las condiciones de fotoperiodo, densidad inicial y tiempo de retención empleados.

1.2 Tasa de consumo de CO_2

La tasa de consumo de dióxido de carbono ($P_{(\text{CO}_2)}$) en el tratamiento con CO_2 , aumentó en promedio un 49% respecto al tratamiento control-aire (Tabla 7). Este aumento puede ser debido a la diferente concentración de CO_2 presente en el medio de cultivo.

Tabla 7. Efecto del CO_2 en la productividad total y tasa de consumo de dióxido de carbono de *C. vulgaris*.

Tratamiento	Productividad total ($\text{g CO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	Tasa de consumo ($\text{g CO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
AIRE	0.184	0.346
CO2	0.262	0.493

Los valores son calculados considerando un 50% de carbono de peso seco

En un estudio con *C. vulgaris* en un biorreactor suministrado por 5% de CO_2 , Sidney *et al.*, (2010) obtuvieron una tasa de consumo de CO_2 de $0.251 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. El tratamiento con CO_2 , en el presente estudio, la $P_{(\text{CO}_2)}$ resultó ser aproximadamente dos veces que la reportada. La variación en los datos puede ser debida a la diferente concentración de CO_2 y

condiciones de biorreactor empleados. Según Cheng *et al.*, (2006) y de Morais y Costa, (2007), la eficiencia de eliminación de CO₂ en sistema cerrado depende de la especie de microalgas, la concentración de CO₂ y del fotobiorreactor. Además, la diferencia de resultados, puede ser atribuida a que la P_(co2) fue calculada por Sidney *et al.*, (2010) en base a mediciones de consumo de CO₂ durante el cultivo, mientras que en el presente ensayo, fue estimada a partir de la productividad total obtenida.

1.3 Análisis bioquímico

1.3.1 Lípidos

En la figura 7. Se muestra el comportamiento del contenido de lípidos durante el cultivo. La concentración de lípidos presentó una tendencia a incrementarse durante el desarrollo del crecimiento para ambos tratamientos.

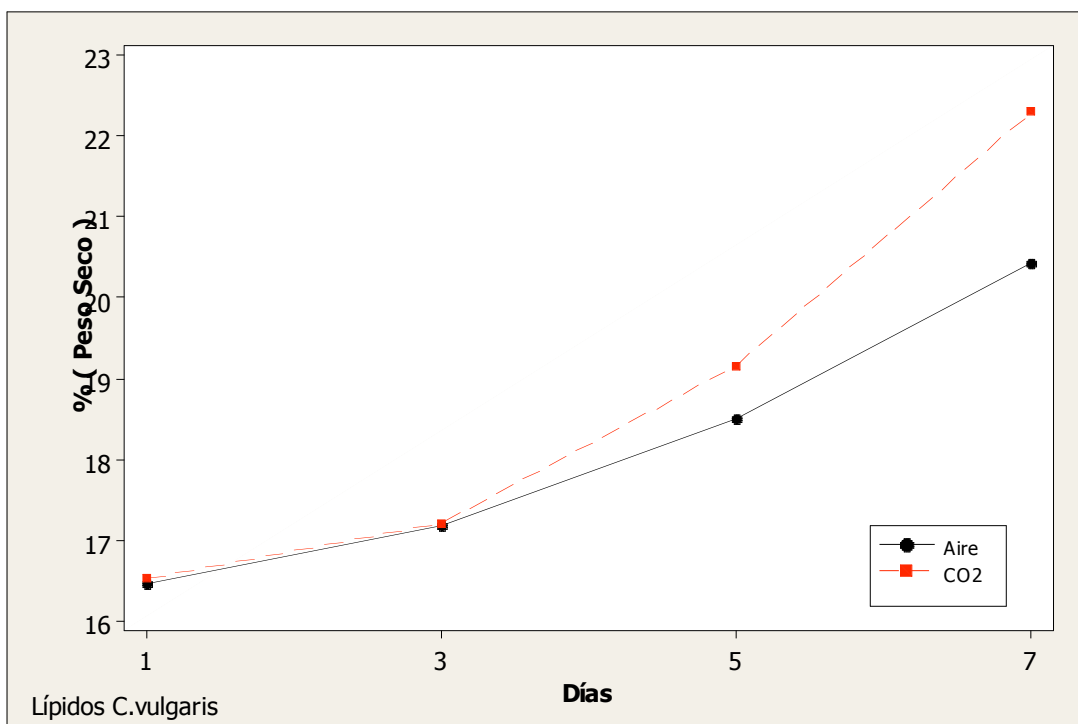




Figura 7. Contenido de Lípidos de *C. vulgaris* cultivada con  aire y  CO₂

La concentración de lípidos por peso seco en el tratamiento con suministro de CO₂, aumentó de 16.52% inicial a 22.29 % final y en el cultivo control-aire de 16.45 % inicial a 20.43% final durante los siete días de cultivo. De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA), se observó una diferencia significativa entre el porcentaje de lípidos del tratamiento con CO₂ y el cultivo control-aire, en el último día de cultivo con P=0.017.

1.3.2 Proteínas

En la figura 8 se muestra el contenido de proteína en *C. vulgaris*, en ella se observa una reducción de la concentración total en ambos tratamientos. En el cultivo con CO₂ se observó un decremento del 58.38% inicial con un 38.85% final. A su vez, el cultivo control-aire disminuyó del 59.23% inicial a un 40.01 % final, del peso seco total.

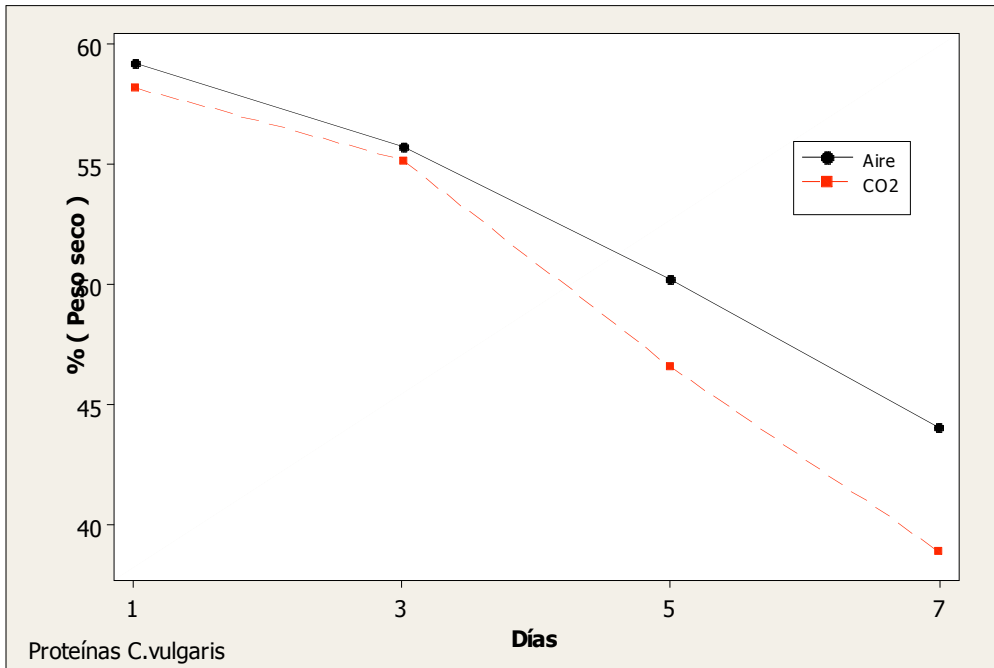




Figura 8. Contenido de Proteínas de *C. vulgaris* cultivada con  aire y  CO₂

En el análisis de varianza (ANOVA), se observó una diferencia significativa en el porcentaje de proteínas totales entre los dos tratamientos hacia el último día de cultivo (6to), $P=0.012$, obteniendo el cultivo con CO₂ un rendimiento de proteína menor que el aire.

1.3.3 Carbohidratos

En la figura 9 se observa en ambos tratamientos un incremento en el porcentaje de carbohidratos por peso seco. Durante el crecimiento celular, el contenido de carbohidratos del cultivo suministrado con CO₂ se incrementó de un 12.26% inicial a un 28.94% final; similarmente, el incremento de carbohidratos del tratamiento control-aire aumentó de 11.25% inicial a un 23.75 % final. La diferencia final en el aumento de carbohidratos entre los tratamiento fue de 5.19%.

En el análisis de varianza (ANOVA), se encuentran diferencias significativas en el día 5 ($P=0.02$) y en el último día de cultivo ($P=0.04$).

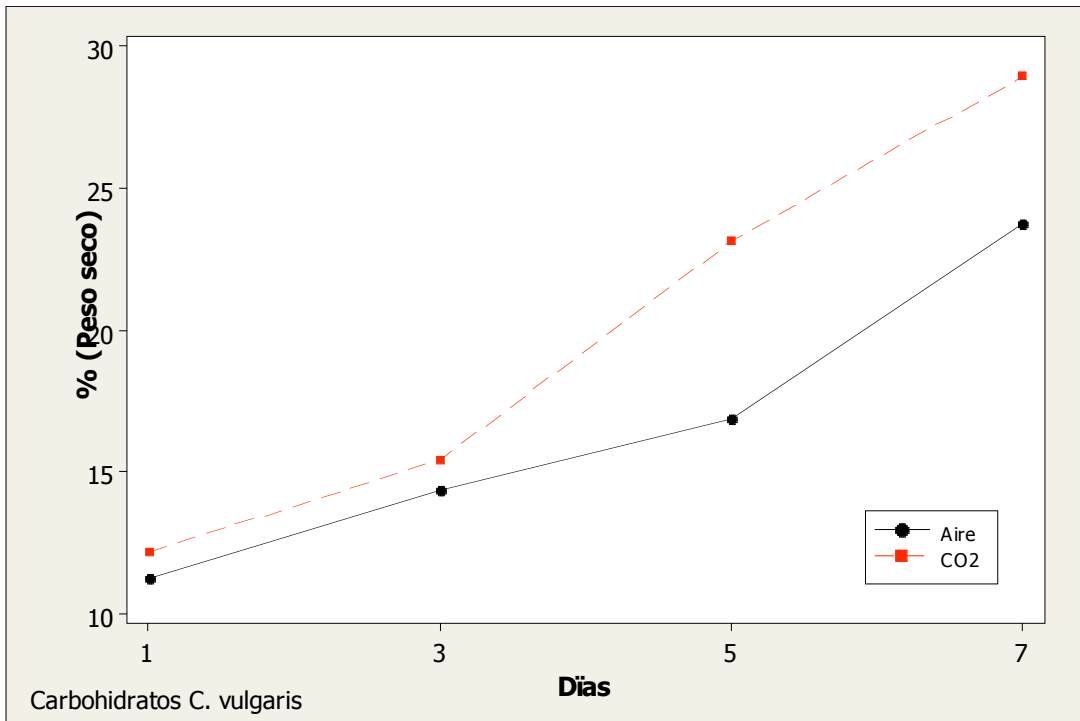




Figura 9. Contenido de Carbohidratos de *C. vulgaris* cultivada con  aire y  CO₂

La composición bioquímica de las células, depende de las condiciones de crecimiento y la etapa en la que se realiza la cosecha. *C. vulgaris* obtuvo un incremento en la concentración de lípidos en la fase estacionaria temprana, lo que se puede deber a que la deficiencia de nitrógeno limita la tasa de síntesis de las estructuras esenciales de las células que incluyen las proteínas y ácidos nucleicos, por lo tanto, la mayor parte de fijación de carbono se convierte en carbohidratos o lípidos (Feng et al., 2010).

Nigam *et al.*, (2011), reportaron que los lípidos en un estudio con *C. pyrenoidosa* se acumularon más en la fase estacionaria que en la fase exponencial. Varios estudios han mostrado que los lípidos tienden a

acumularse en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Pruvost *et al.*, 2011). A su vez, Lv *et al.*, (2010) en un cultivo batch de *C. vulgaris* con 1 % de CO₂, reporta cambios en la composición bioquímica, un decremento en el contenido de proteínas del 70% al 7%, un aumento en carbohidratos de 13% al 70% y un aumento en lípidos de 18% al 25%.

Está bien documentado que bajo condiciones de crecimiento limitantes, el nitrógeno necesario para la síntesis de proteínas se agota y conlleva a la síntesis de incremento de lípidos y carbohidratos. Los datos obtenidos en el presente estudio concuerdan con éste comportamiento. La diferencia en el porcentaje final de lípidos entre los dos tratamientos puede ser atribuida a la adición de CO₂ a los cultivos.

2 *Scenedesmus Dimorphus*

Para evaluar el efecto del CO₂ en el crecimiento de *S. dimorphus* fueron cultivados dos tratamientos en modo semicontinuo durante 120 horas. La concentración inicial promedio de los cultivos fue de 1×10^{-6} células por mililitro. El tratamiento control fue suministrado con aire ($\approx 0.033\%$ de CO₂), y un segundo tratamiento por el suministro constantemente de una mezcla de aire con un gradiente de CO₂ con concentraciones variables a través del tiempo que fueron de 2.5%, 5.2 y 11%.

2.1 Crecimiento celular

La máxima concentración celular de *S. dimorphus* (34.83×10^6 cel ml⁻¹) en el tratamiento con CO₂ y en el tratamiento control-aire (25.98×10^6 células ml⁻¹) se alcanzó en el quinto día de cultivo. El análisis de

varianza (ANOVA) unidireccional realizado por día de cultivo y la comparación de medias por estadísticos de Fisher y Tukey, encontró diferencias significativas ($P < 0.05$) en la concentración de biomasa entre los dos tratamientos, a partir del segundo día de cultivo hasta el séptimo día.

El efecto de diferentes concentraciones de CO_2 , en el crecimiento celular de *S. dimorphus*, se muestra en las Figuras 10 y 11.

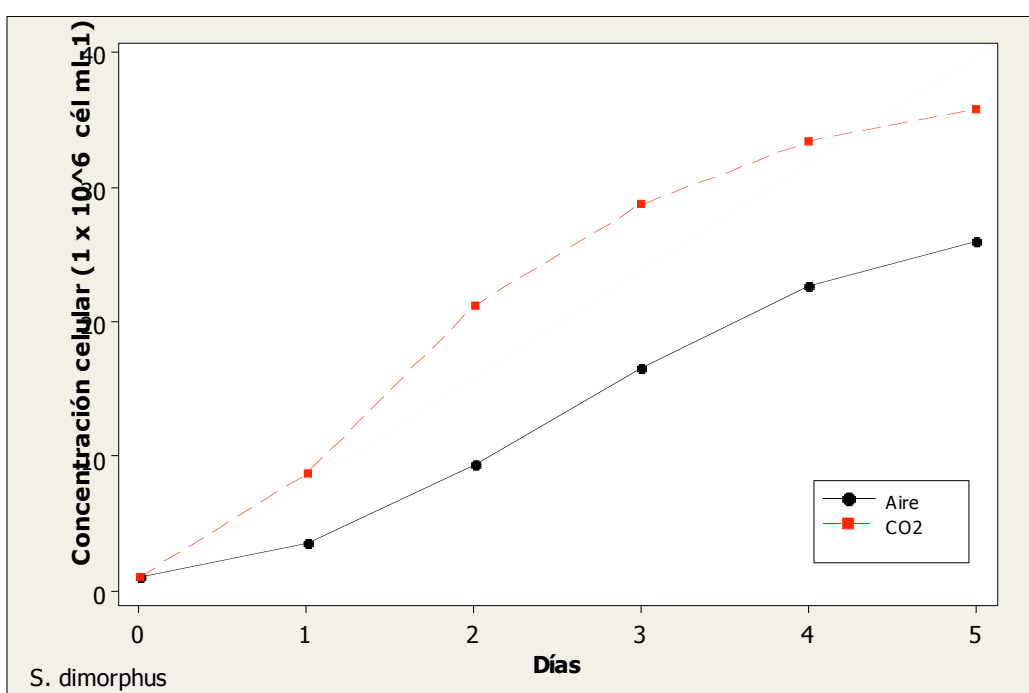


Figura 10. Curva de crecimiento de *S. dimorphus* cultivada con aire y aire enriquecido con incrementos de CO_2 .

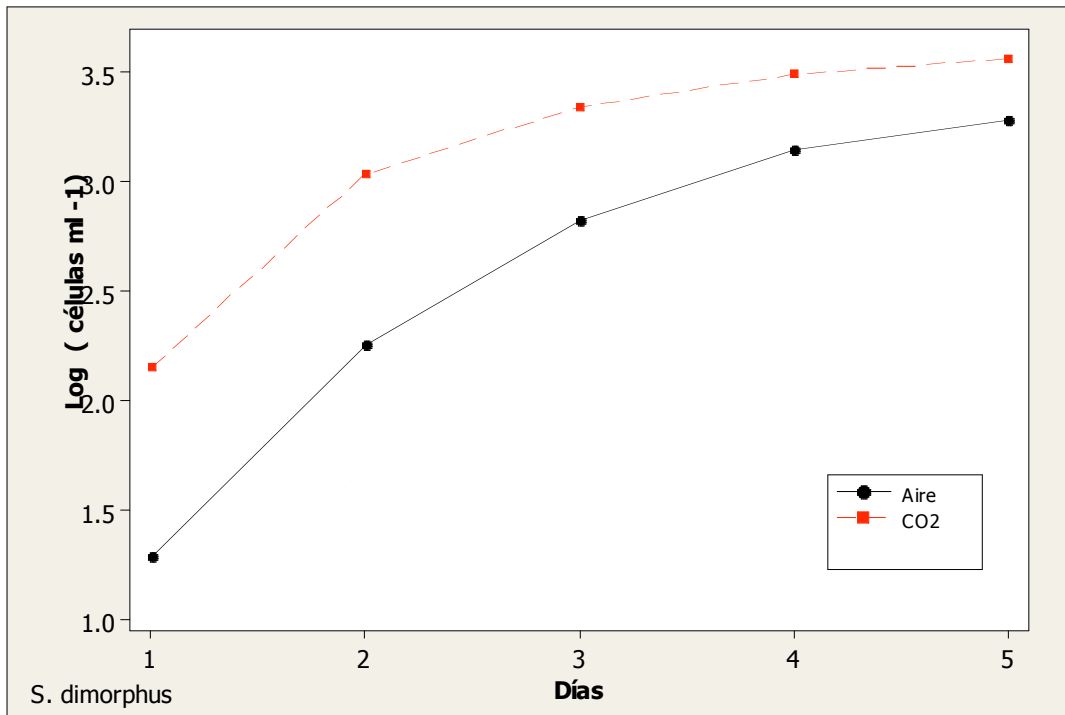


Figura 11. Curva de crecimiento específico de *S. dimorphus* —●— aire y —■— CO₂

Como se muestra en las figuras 10 y 11, la fase de adaptación no se detecta en ambas condiciones de cultivo. En el tratamiento con CO₂, la fase de crecimiento exponencial concluye en el día 2; en esta fase se logra la tasa máxima de crecimiento ($\mu_{max} = 2.15 \text{ día}^{-1}$). A partir del día 2 la tasa de crecimiento específico (μ_e) disminuye (0.877 día^{-1}), por lo que se presenta la fase estacionaria que se prolonga tres días y comienza la fase de estacionamiento temprana con una $\mu_e = 0.069 \text{ día}^{-1}$. En el tratamiento control-aire, la fase exponencial (día 3) alcanza una $\mu_{max} = 1.18 \text{ día}^{-1}$ y el valor de μ_e disminuye a 0.939 día^{-1} (fase de desaceleración), y continúa disminuyendo hasta el día 5 (0.136 día^{-1}), momento en que da inicio de la fase estacionaria. En la tabla 8 se muestran los datos de productividad de los dos tratamientos durante el crecimiento celular.

2.1.1 Determinación de la biomasa

A partir de la relación entre la densidad óptica y la concentración celular, expresada en gramos por litro, obtenidos por la determinación de peso seco, se obtuvo la ecuación de la recta por medio de regresión lineal, obteniendo la ecuación:

$$y = 0.469 x + 0.0067 \quad (R^2 = 0.9946)$$

Donde:

Y: Concentración de biomasa (g L^{-1}) y x: Densidad óptica (Abs 680 nm)

Tabla 8. Efecto del CO_2 en el crecimiento celular de *S. dimorphus*.

	Tratamiento Control-aire	Tratamiento con CO_2
Concentración de biomasa promedio	0.665 (g L^{-1})	0.711 (g L^{-1})
Máxima concentración de biomasa	1.306 (g L^{-1})	1.748 (g L^{-1})
Tasa máxima de crecimiento (μx)	1.28 día ⁻¹	2.15 día ⁻¹
Productividad máxima (Pmax)	0.64 g L^{-1} día ⁻¹	0.70 g L^{-1} día ⁻¹

En un estudio con siete cepas aisladas de la especie *Scenedesmus obliquus* en fotobiorreactor con suministro de 20 % de CO_2 , Ho *et al.*, (2010), reportaron que la concentración máxima de biomasa osciló entre 1.13 y 2.63 g L^{-1} . Las tasas más altas de crecimiento (μ_{max})

alcanzadas fueron de 0.613 y 1.115 d⁻¹ y las P_{xmax} de 0.280 y 0.382 gL⁻¹ d⁻¹. Comparando los resultados del presente trabajo con la especie *Scenedesmus dimorphus*, el tratamiento con el gradiente de CO₂ obtuvo valores superiores de μ_{max} (2.15 día⁻¹) y de P_{xmax} (0.70 gL⁻¹ d⁻¹.) que *S. obliquus*. La concentración máxima (1.7 g L⁻¹) se encontró dentro del rango reportado.

2.2 Tasa de consumo de dióxido de carbono

El cultivo con CO₂ obtuvo una mayor tasa de consumo de CO₂, ≈39 % mas respecto al tratamiento control-aire (Tabla 9).

Tabla 9. Tasa de producción total y consumo de CO₂ de *S. dimorphus*

Tratamiento	Productividad total (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa de consumo (g CO ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)
Aire	0.250	0.470
Gradiente de CO ₂	0.348	0.654

Ho *et al.*,(2010) reportan una $P(\text{CO}_2)$ de 0.390 gL⁻¹ d⁻¹ en *Scenedesmus* sp., cultivada en un fotobioreactor con 20 % de CO₂. Este dato representa un 59 % de la tasa obtenida en este estudio y esta diferencia puede ser atribuida a las diferentes condiciones de cultivo, como la concentración de CO₂, el medio de cultivo, el tiempo de incubación y la especie utilizada.

2.3 pH

En la figura 12 se observa el comportamiento del pH a través del tiempo en los tratamientos con gradiente de CO₂ y el control-aire.

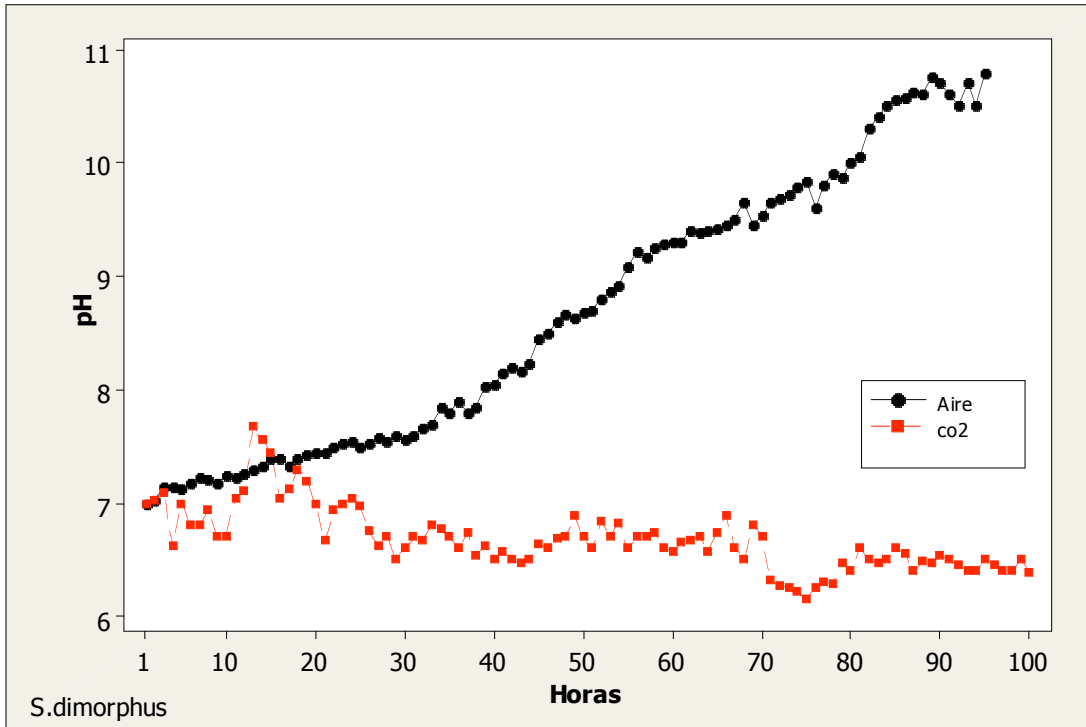




Figura 12. Evolución del pH de *S. dimorphus* en los cultivos con  CO₂ y  aire.

En el tratamiento control-aire, se observa un incremento del pH en un rango de 7.0 a 10.8 después de 100 horas de cultivo. En el tratamiento con un gradiente de CO₂, se observó un decremento del pH en un rango de 7 a 5.7 durante el tiempo incubación. Este comportamiento registró una suave pendiente conforme se incrementaron las concentraciones de CO₂ en el medio. En la primera etapa del cultivo (0-24 horas), con 2.5 % de CO₂, se registró un pH promedio de 7, en la segunda etapa (24-70 horas) con 5.2% de CO₂, el pH promedio fue de 6.68. En la última etapa del cultivo se registró un pH promedio de 6.42.

El carbono inorgánico disuelto (CID) en el medio de cultivo compuesto de CO_2 , HCO_3^- y CO_3^{2-} , representa la fuente de carbono para el crecimiento de las microalgas. El CO_2 en primer lugar, se combina con H_2O para formar H_2CO_3^* que se disocia en HCO_3^- y H^+ , el HCO_3^- más adelante se disocia en CO_2 o CO_3^{2-} , dependiendo del pH del medio (Morais y Costa, 2007). La anhidrasa carbónica extracelular, una enzima clave en el mecanismo de la concentración de carbono, cataliza la conversión entre HCO_3^- y el CO_2 y junto con ello facilita la absorción de CO_2 en la célula.

El rango de pH observado en el tratamiento control con suministro de aire, indica que la especie HCO_3^- fue la forma de carbono predominante en el cultivo. Widjaja *et al.*, (2009), señalan que las microalgas utilizan HCO_3^- para mantener su crecimiento, como una compensación por carecer de suficiente suministro del gas CO_2 , lo que dará como resultado el aumento del pH. De acuerdo a Jacob-Lopes *et al.* (2008), el aumento en el pH en cultivos fotosintéticos es una indicación del consumo de carbono inorgánico debido al crecimiento celular. Se ha demostrado que los cultivos de microalgas causan un aumento en el pH de hasta 10-11 en estanques abiertos debido a la absorción de CO_2 . Este aumento en el pH puede ser beneficioso para la inactivación de patógenos en el tratamiento de aguas residuales por microalgas, pero puede también inhibir el crecimiento de las microalgas (Kumar *et al.*, 2010).

Los resultados del estudio con *S. dimorphus*, muestran que esta especie es capaz de mantener su crecimiento en rango de pH de 5.7 a 10.8, sin registrar inhibición en el crecimiento, y lo realiza tanto en cultivos suministrados con aire como en cultivos con abastecimiento constante de CO_2 . Esta capacidad de sobrevivir en un amplio rango de pH favorece la aplicación de cultivos de microalgas en condiciones con un

pH bajo, debido a la exposición de los gases de combustión o a un pH más alto cuando la fuente de CO₂ no es suficiente.

Moazami-Goudarzi y Colman (2012), examinaron los mecanismos de adquisición de carbono inorgánico en dos microalgas verdes marinas *S. minor* y *S. cylindricus*, y demostraron que ambas especies tienen la capacidad de absorción activa de CO₂ y bicarbonato cuando se cultivan a pH 8.2.

En el presente trabajo, se observó una disminución en la tasa de división celular durante el incremento en el suministro de 5.2 al 11% de CO₂. Esta reducción puede deberse a que el incremento del CID provoca la disminución del pH del medio y esto, a su vez, la reducción de la actividad de la anhidrasa carbónica extracelular, que cataliza la absorción del CO₂ para el crecimiento celular.

Chen *et al.* (2006), señalan que un aumento en la concentración de CO₂ podría ser perjudicial en el consumo de carbono por la microalga lo que resulta en la pérdida del mecanismo de concentración de carbono y la inhibición del crecimiento.

2.4 Análisis bioquímico

2.4.1 Lípidos

La concentración de lípidos, presentó una tendencia a incrementarse durante el desarrollo del crecimiento para ambos tratamientos (figura 13).

El contenido de lípidos en el tratamiento con CO₂, se incrementó de un 13.41 % a un 14.37 % de peso seco. En el tratamiento control-aire, la concentración aumentó de un 13.46% a un 14.69%.

Sin embargo, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA), este aumento en la concentración no presenta diferencia significativa en el porcentaje de lípidos entre el cultivo con incrementos de CO₂ y el cultivo control-aire.

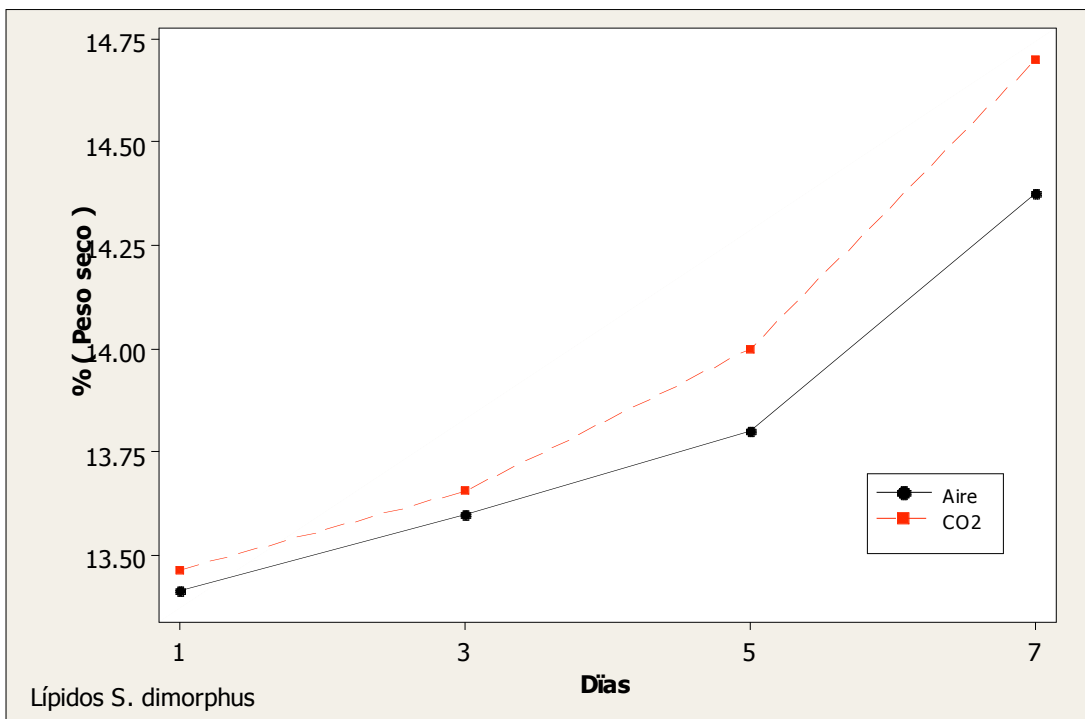




Figura 13. Acumulación de Lípidos de *S. dimorphus* cultivada con  aire y  CO₂

2.4.2 Proteínas

En el tratamiento control-aire, se observa un incremento en la concentración de proteínas del 53.05% inicial al 54.5 % en el primer día, seguido de una disminución hasta el 42.81% del último día de cultivo (Figura 14).

En el tratamiento con gradiente de CO₂, se observó en el día 1 (2.5% de CO₂) una disminución del contenido protéico, en el día 3 (5.2% de CO₂) un repunte al 61.8% y en el día 5 (11% CO₂) un decremento al 55.3%.

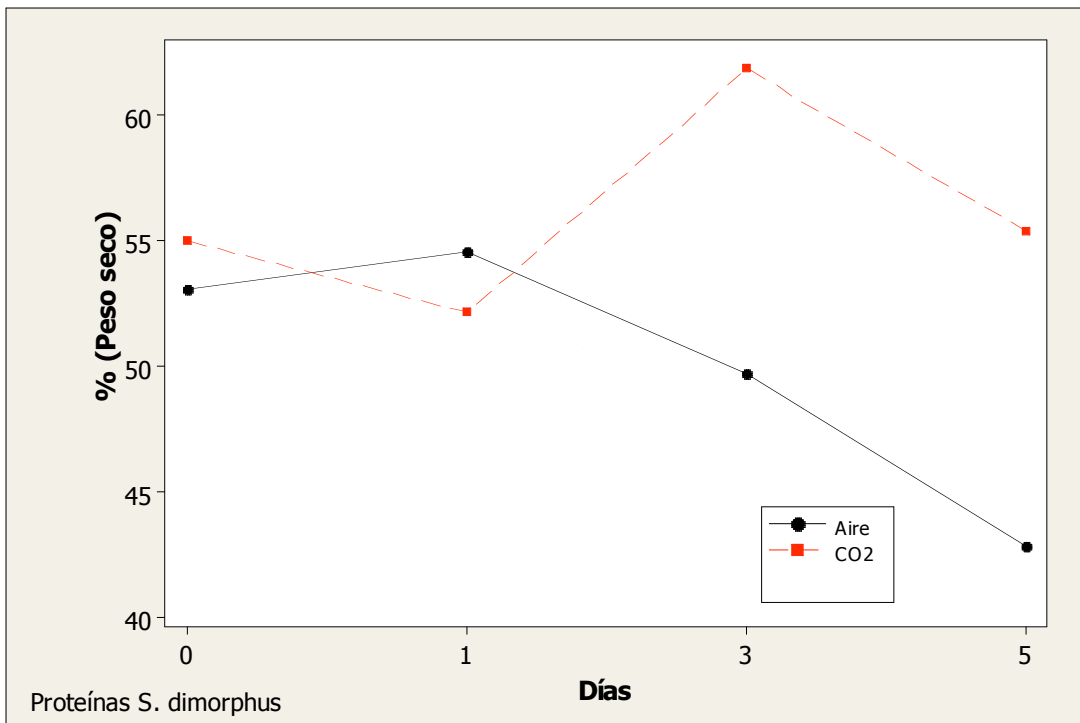




Figura 14. Acumulación de Proteínas de *S. dimorphus* cultivada con  aire y  CO₂

En el análisis de varianza (ANOVA), se observó una diferencia significativa en el porcentaje de proteínas totales entre los dos tratamientos en el día 3 ($P=0.026$) y último día de cultivo ($P=0.001$), obteniendo el cultivo con CO_2 un rendimiento de proteína mayor que el control con aire.

2.4.3 Carbohidratos

En la figura 15, se observa un incremento en el contenido de carbohidratos en ambos tratamientos. Para el tratamiento con gradiente de CO_2 , se observó un aumento de 13.41% al 14.37%. Para el tratamiento control-aire, se observó un aumento 13.46% al 14.49%.

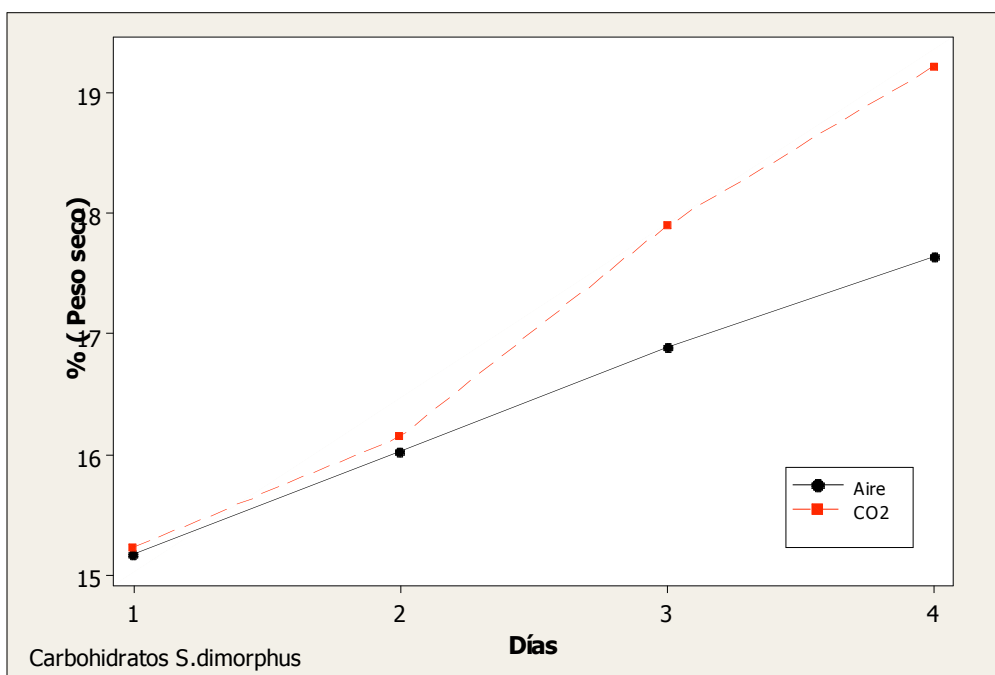


Figura 15. Acumulación de Carbohidratos de *S. dimorphus* cultivada con aire y CO_2 .

En el análisis de varianza (ANOVA), no fueron observadas diferencias significativas entre en la concentración de carbohidratos por tratamiento.

3 Cultivo de *Chlorella sorokiniana*

C. sorokiniana, fue cultivada controlando un pH constante mediante la inyección automática de CO₂. En el primer tratamiento se fija un pH de 6.3, en el segundo un pH de 7. En el tercer tratamiento como control, no se administra CO₂ adicional a la fuente de suministro de aire ambiente.

Los cultivos se llevaron a cabo en modo semicontinuo, durante 120 horas, con una concentración inicial promedio de 2.5×10^{-6} células ml⁻¹.

3.1 Crecimiento celular

3.1.1 Concentración celular

La concentración celular máxima alcanzada por *C. sorokiniana* en el tratamiento a pH=7, aumentó 53%, y el tratamiento a pH=6.3 un 34%, respecto a la obtenida en el tratamiento del cultivo Control-Aire (Tabla 10). En el análisis de varianza (ANOVA), se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración celular de los dos tratamientos de CO₂ (pH 6.3 y pH 7.0), comparados al tratamiento control-aire a partir del segundo día y hasta el último día de cultivo.

Tabla 10. Efecto del CO₂ en la concentración celular máxima de *C. sorokiniana*.

Tratamiento	Células mililitro ⁻¹	Gramos Litro ⁻¹
Aire	29.11 x 10 ⁶	1.444
CO ₂ pH 6.3	39.15 x 10 ⁶	1.946
CO ₂ pH 7	44.38 x 10 ⁶	2.208

3.1.2 Curva de crecimiento

El comportamiento del crecimiento celular de *C. sorokiniana*, bajo diferentes condiciones de cultivo, se muestra en la figura 16.

Graficando contra el tiempo la suma progresiva de las divisiones celulares (figura 17), no se observa que en los tres tratamientos la fase *lag* o de adaptación. La fase de crecimiento exponencial ocurre hasta el día dos en los 3 cultivos. A partir del día dos, y hasta el último día de cultivo, en los tres tratamientos comienza la fase de desaceleración debido a la disminución de la tasa de crecimiento. En el la curva de crecimiento no es posible detectar la fase estacionaria.

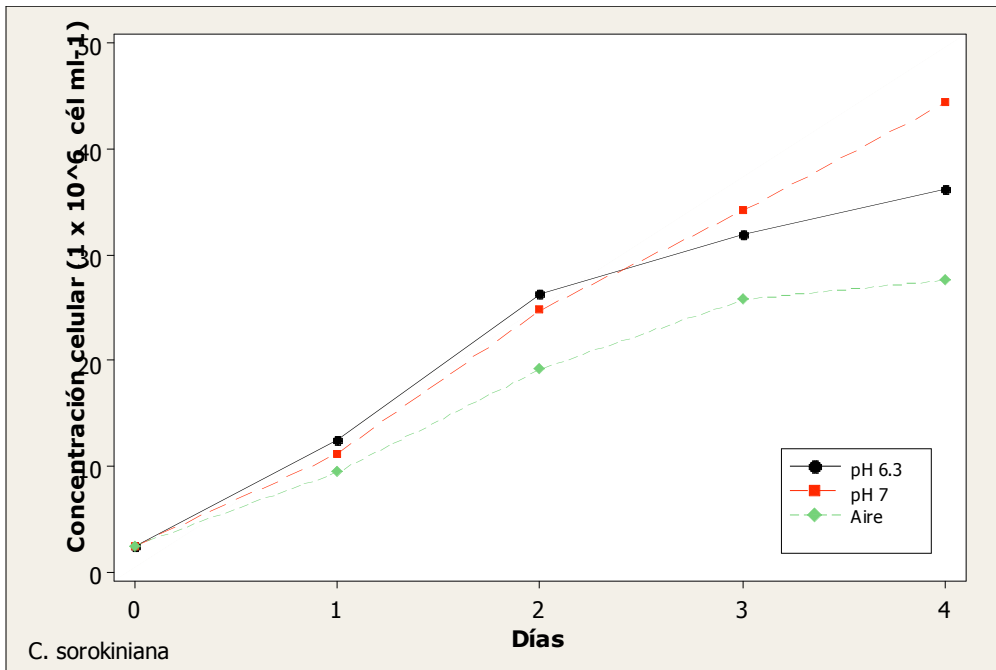


Figura 16. Curva de crecimiento de *S. dimorphus* bajo diferentes condiciones de cultivo —◆— aire, —●— pH 7 y pH —■— 6.3

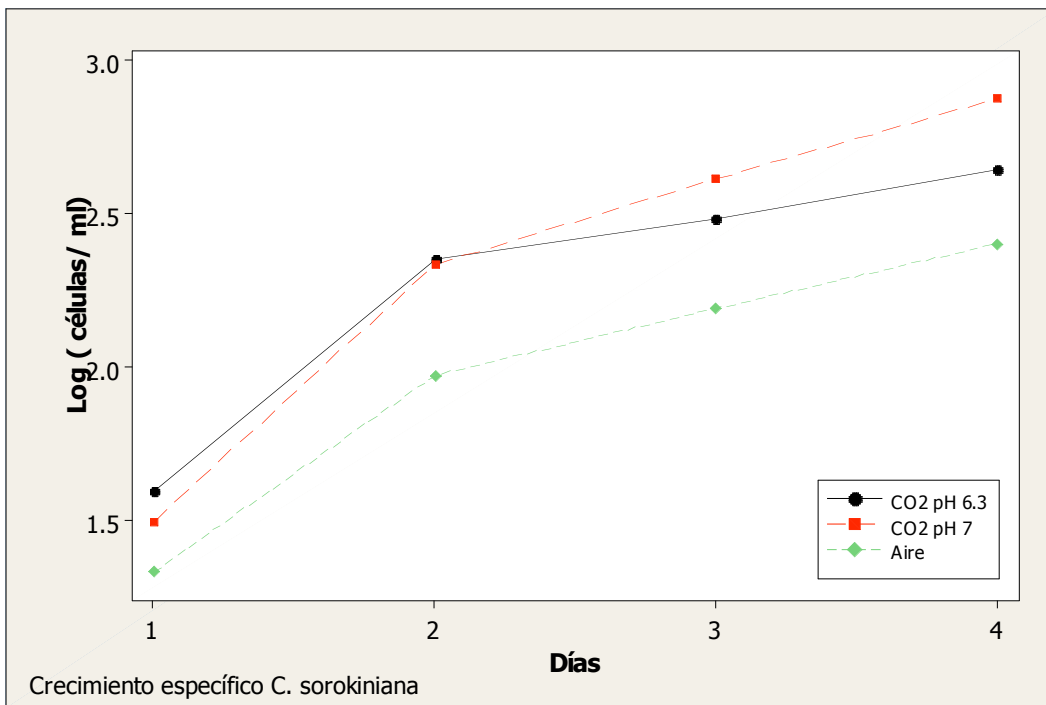


Figura 17. Crecimiento específico de *C. sorokiniana* bajo las condiciones de cultivo de —◆— aire y CO2 con —●— pH 6.3 y pH —■— 7.

El tratamiento con un pH 7.0, muestra una tasa de crecimiento ($0.7482 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) más alta en comparación con los cultivos a pH 6.3 ($0.7089 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y Control-Aire ($0.6377 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

3.1.3 Determinación de biomasa

A partir de la relación entre la densidad óptica y la concentración celular expresada en gramos por litro, obtenidos por la determinación de peso seco, se obtuvo la ecuación de la recta por medio de regresión lineal, obteniendo la ecuación:

$$y = 0.4668 x - 0.0022 \quad (R^2 = 0.9953)$$

Donde:

Y: Concentración de biomasa (gL^{-1}) y X: Densidad óptica (Abs 680 nm)

3.1.4 Tasa de crecimiento

En los 3 tratamientos, la más alta tasa de división celular se registró durante el crecimiento exponencial al segundo día de cultivo. Los resultados de los cálculos de la tasa de crecimiento y productividad de *C. sorokiniana* se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Efecto del CO₂ en la Tasa de crecimiento y productividad máxima de *C. sorokiniana*.

Tratamiento	Día de cultivo	Tasa máxima de crecimiento (μ_{max})	Productividad máxima (P_{xmax})
Aire	2	1.34 día ⁻¹	0.52 g L ⁻¹ día ⁻¹
pH 7	2	1.67 día ⁻¹	0.73 g L ⁻¹ día ⁻¹
pH 6.3	2	1.52 día ⁻¹	0.68 g L ⁻¹ día ⁻¹

El tratamiento con pH 7.0, registró los valores más altos de tasa máxima de crecimiento (1.67 día⁻¹) y productividad máxima (0.73 g L⁻¹ día⁻¹), aumentó la μ_{max} un 40% y su P_{xmax} un 24.5% respecto a los valores registrados por el tratamiento control-aire.

El tratamiento de pH 6.3, registró un aumento en sus valores de μ_{max} de 13.4% y de P_{xmax} de 30.7%, respecto a los valores registrados del tratamiento Control-Aire.

Existen estudios que describen el cambio de la tasa de crecimiento en varias especies de microalgas, por ejemplo, Greque y Veira (2007), informan que la tasa de crecimiento de la diatomea *Chaetoceros wighamii* y la microalga *Tetraselmis sp.* aumentó cuando el dióxido de carbono fue añadido a su medio de crecimiento.

3.1.5 Tasa de consumo de CO₂

De acuerdo a la productividad total obtenida se calculó la tasa de consumo de dióxido de carbono del cultivo de *C. sorokiniana* (tabla 12).

Tabla 12. Tasa de productividad total y tasa de consumo de CO₂ de *S. dimorphus*.

Tratamiento	Productividad total (g CO ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)	Tasa de consumo (g CO ₂ L ⁻¹ d ⁻¹)
Aire	0.313	0.590
CO ₂ pH 6.3	0.408	0.767
CO ₂ pH 7	0.523	0.984

La tasa de consumo de CO₂, fue más alta en el tratamiento con pH 7.0, siendo aproximadamente el doble del consumo de CO₂ del tratamiento control-aire.

3.2 Análisis bioquímico

3.2.1 Lípidos

En la figura 18, se muestra la acumulación de lípidos en los dos tratamientos de cultivo.

El porcentaje de lípidos de *C. sorokiniana* fluctuó entre 15.71% y 15.97% aproximadamente para todos los tratamientos, no presentó diferencia significativa de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

El contenido de lípidos en *C. sorokiniana*, no presenta cambios con el suministro de CO₂.

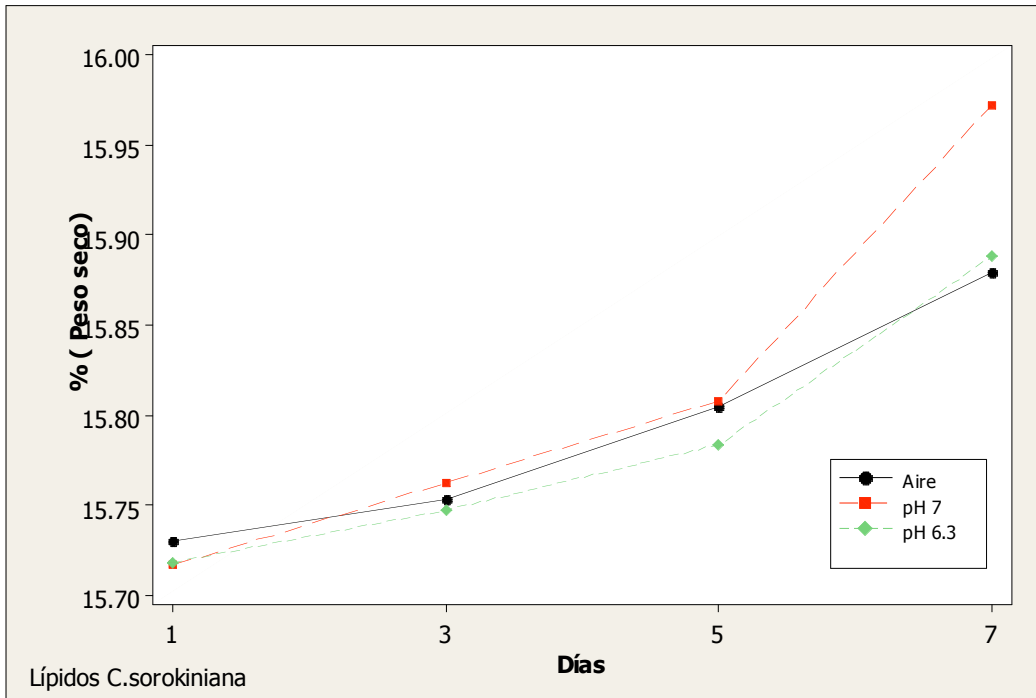




Figura 18. Acumulación de Lípidos de *C. sorokiniana* cultivada con  aire y  CO₂

Estudios realizados por Wan *et al.*, (2011), reportan en *C. sorokiniana* una concentración mayor que el estudio presente, logrando un 27% de su peso seco en condiciones fototróficas en 23 días dentro de la fase estacionaria. Además, se reporta en condiciones mixotróficas una concentración lipídica de hasta 45%, lo cual indican el potencial que puede tener esta nueva cepa aislada de *C. sorokiniana* en el estudio.

3.3 Proteínas

La concentración de proteínas en *C. sorokiniana*, se incrementó durante el desarrollo de los tres tratamientos (Figura 19). El porcentaje de proteínas en el tratamiento con CO₂-pH7 aumentó de 51.63% inicial a un 56.49% final. En el tratamiento pH 6.3 se observó un aumento del

50.04% inicial al 57.20% final. El menor incremento en la concentración de proteínas totales corresponde al tratamiento control-aire con valores de 49.04% inicial al 51.68% final.

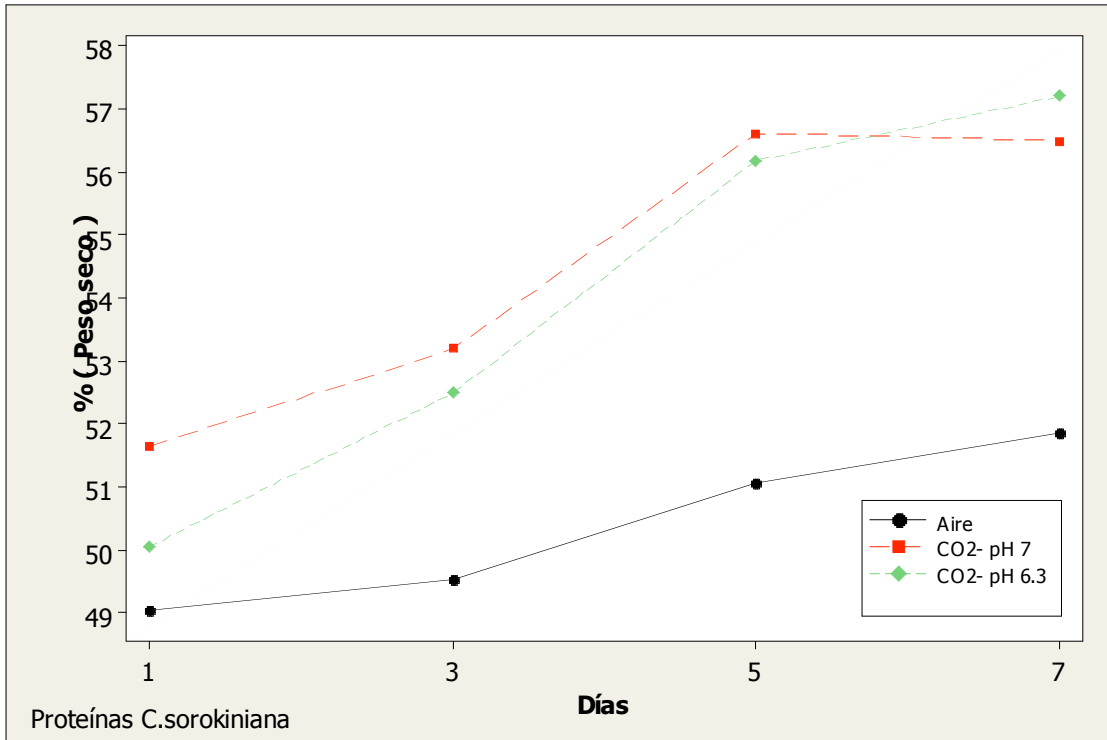




Figura 19. Proteínas de *C. sorokiniana* cultivada con  aire y  CO₂ con diferente pH.

En el análisis de varianza (ANOVA), se observan diferencias significativas de los 2 tratamientos suministrados con CO₂, respecto al tratamiento control-aire a partir del segundo día de cultivo. No se observan diferencias significativas entre los dos tratamientos con CO₂.

3.3.1 Carbohidratos

La figura 20 muestra la concentración de carbohidratos en *C. sorokiniana*, en ella se observa un incremento durante el desarrollo de los 3 tratamientos.

El porcentaje de carbohidratos en el tratamiento con CO₂-pH 7.0, aumentó de 9.58% inicial a un 18.86% final. En el tratamiento CO₂-pH 6.3 se observó un aumento del 10.15% inicial al 18.49% final. El menor incremento en la concentración de carbohidratos, corresponde al tratamiento control-aire con valores de 10.41% inicial a 16.61% final.

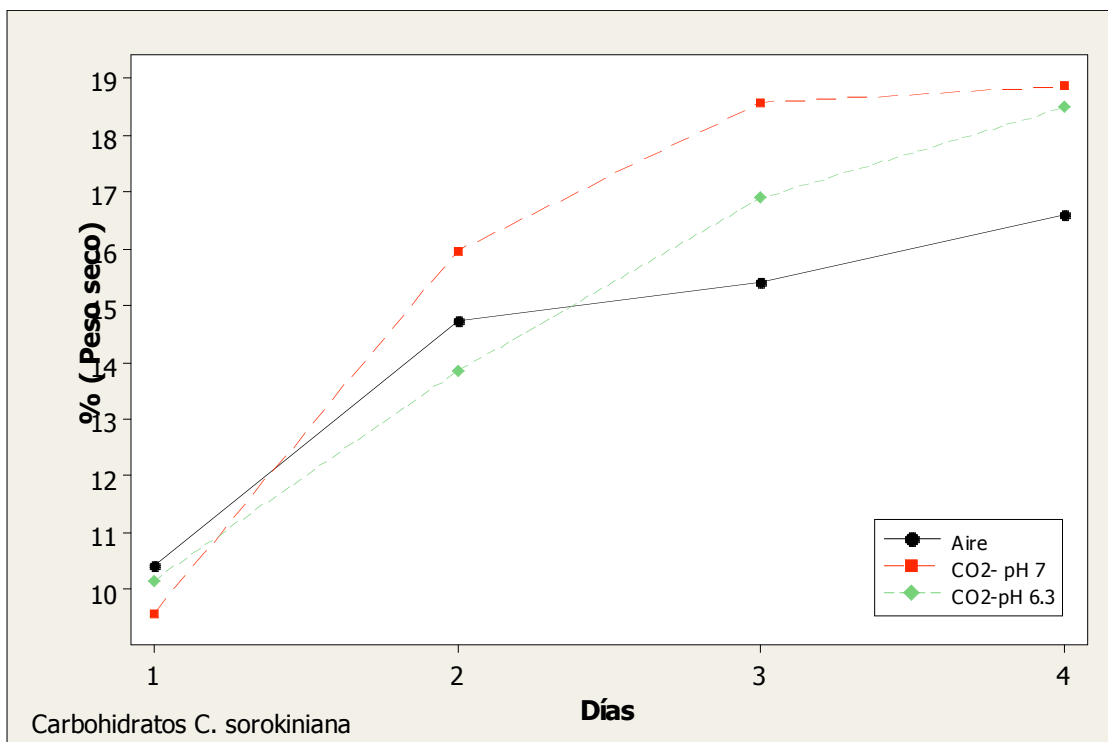




Figura 20. Acumulación de carbohidratos de *C. sorokiniana* cultivada con  aire y  CO₂.

En el análisis de varianza (ANOVA) se encuentran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los 3 tratamientos a partir del día dos. En

el último día de cultivo no se observan diferencias significativas entre los dos tratamientos con CO₂.

Wan *et al.*, (2011), han reportado los cambios en la composición bioquímica de *C. sorokiniana* en un cultivo discontinuo bajo condiciones fototróficas por 23 días: el contenido de proteína disminuyó del 70% al 7%; el de carbohidratos totales un aumento del 13% al 70% y en lípidos totales un aumento del 18% al 25%, usando sólo aire. Comparando estos con los del presente estudio tratados con CO₂ es mayor el porcentaje de proteínas (57.2%), y el porcentaje de carbohidratos (18.87%) y lípidos (15.97%) es de menor magnitud. Para estas variaciones, sería importante evaluar el cambio que podría experimentar la composición bioquímica hasta una fase estacionaria tardía, siendo esta fase donde se reportan concentraciones mayores de lípidos y carbohidratos y concentraciones menores de proteínas.

Es importante recalcar que, bajo las condiciones de fotobioreactor de CO₂ del presente estudio, la concentración celular máxima calculada (2.2 gL⁻¹) es mayor que la reportada por Wan *et al.* 2011, (1.45 gL⁻¹), que fueron obtenidas en condiciones de alimentación con glucosa. Esta característica de aumento de biomasa en biorreactor, puede ser favorable para desarrollar estrategias de cultivo donde pueda combinarse métodos que aumenten el parámetro bioquímico de interés de *C. sorokiniana*.

4 Aislamiento y Extracción de ADN de muestras de microalgas.

Fueron aisladas muestras de ADN a partir de los cultivos de microalgas de *C. vulgaris* y la cepa aislada.

Para ambas muestras, la extracción de ADN con el KIT Lyse´N´Trap Tissue DNA Isolation Kit (Biopolymer Isolation Technologies, LLC), resultaron altamente puras, con valores superiores a 260/280 nm > 1.8 y 260/230 nm >1.8, indicador de ausencia de contaminantes proteicos o residuales de la extracción.

4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para la identificación de especies de microalgas, se usaron los pares de cebadores NS1-NS2, CS1- CS2 y CS3-CS4.

Se amplificaron seis productos de PCR para los 3 pares de cebadores empleados, uno que amplifica dentro del DNA nuclear (NS1-NS2) y dos pares que amplifican para el DNA de cloroplasto (CS1-CS2 y CS3-CS4). Las reacciones resultantes, produjeron específicamente para cada amplificación una sola banda de ADN (Figura 21).

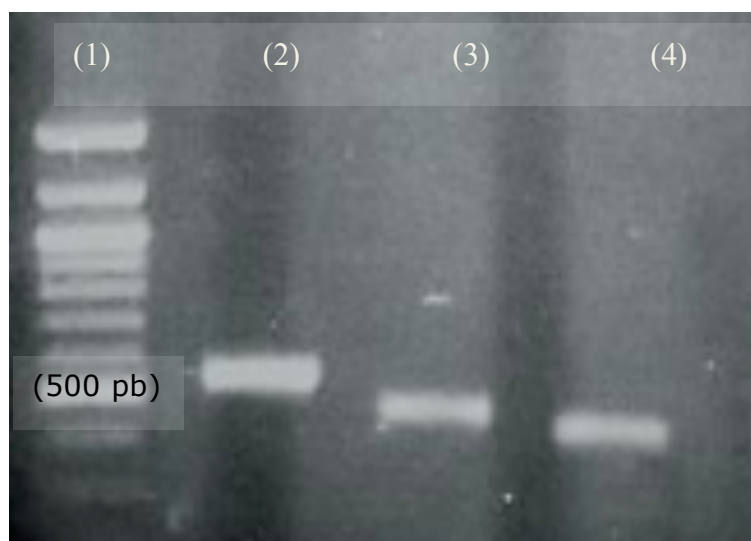


Figura 21. Productos de PCR para los pares de cebadores empleados para cada muestra. 1) Pozo 1 Estándar molecular TriDye100 pb (NEB) se marcan dos bandas correspondientes con tamaños de 400 y 500 pares de bases; 2) Amplificación con el par de cebadores NS1-NS2 de la muestra Aislada; 3) Amplificación con el par de cebadores CS1-CS2 de la muestra Aislada (aproximadamente 470 pares de bases); 4) Amplificación con el par de cebadores CS3-CS4 de la muestra Aislada (aprox. 400 pares de bases).

4.2 Secuenciación

En la Tabla 13, se muestran los números de base resultantes de la secuenciación de los 3 productos de PCR de *C. vulgaris* y de la cepa aislada. Todas las secuencias proporcionaron datos de alta calidad.

Tabla 13. Productos de PCR de las muestras *C. vulgaris* y la cepa aislada. Se señalan para cada secuencia los pares de cebadores usados, la región del genoma que amplifica, y el número de pares de bases de alta calidad que resultaron de la secuenciación.

Organismo muestra	Cebadores usados	Pares de bases
<i>C. vulgaris</i>	NS1-NS2 (Subunidad Pequeña de DNA ribosomal nuclear)	494
<i>C. vulgaris</i>	CS1-CS2 (Subunidad Pequeña de DNA ribosomal mitocondria)	464
<i>C. vulgaris</i>	CS3-CS4 (Subunidad Pequeña de DNA ribosomal mitocondria)	418

Cepa asilada	NS1-NS2 (Subunidad Pequeña de DNA ribosomal nuclear)	533
Cepa aislada	CS1-CS2 (Subunidad Pequeña de DNA ribosomal mitocondrial)	473
Cepa aislada	CS3-CS4 (Subunidad Pequeña de DNA ribosomal mitocondria)	417

4.3 Análisis de Secuencias e Identificación Taxonómica usando BLAST.

Se analizaron 3 secuencias de nucleótidos de la muestra de *C. vulgaris* y 3 secuencias de nucleótidos de la cepa aislada dentro del programa de Internet Blast, bajo la modalidad de Blas/ Nucleotide. Los resultados de la búsqueda en la base de datos se resume en las tablas 14 y 15.

Tabla 14. Análisis e identificación molecular de la especie *C.vulgaris* UTEX. Se presentan las descripciones de secuencias nucleotidica de organismos resultantes con los valores mas altos de similitud y probabilidad (valor E) a la secuencia de *C. vulgaris* con los tres productos de PCR (NS1-NS2, CS1-CS2, CS3-CS4). Número de pares de bases de las secuencias sometidas que resultaron en 100% de similitud a la base de datos GenBank (*).

<i>Chlorella vulgaris</i> NS1-NS2		
No. de Acceso GenBank	Descripción de Organismo obtenido de la base de datos NCBI GenBank	Valor E
FM205855.1	<i>Chlorella vulgaris</i> gen 18S rRNA (parcial), ITS1, gen 5.8S rRNA, ITS2 y gen 28S rRNA (parcial), cepa CCAP 211/82	0.0 (494/494*)
FM205854.1	<i>Chlorella vulgaris</i> gen 18S rRNA (parcial), ITS1, gen 5.8S rRNA , ITS2 y 28S rRNA gene (parcial), cepa CCAP 211/81	0.0 (494/494*)
FM205853.1	<i>Chlorella vulgaris</i> gen 18S rRNA (parcial), ITS1, gen 5.8S rRNA, ITS2 y gen 28S rRNA (parcial), cepa CCAP 211/80	0.0 (494/494*)
<i>Chlorella vulgaris</i> CS1-CS2		
No. de Acceso	Descripción de Organismo	Valor E
AB001684.1	<i>Chlorella vulgaris</i> gen 16S RNA, secuencia parcial; cloroplasto, gen para producto cloroplasto	0.0 (467/467*)
X16579.1	<i>Chlorella vulgaris</i> C-27 DNA cloroplasto, secuencia completa	0.0 (467/467*)
AJ242754.1	<i>Chlorella vulgaris</i> DNA cloroplasto para RNA ribosomal de la subunidad pequeña	0.0 (467/467*)
AJ242753.1	<i>Chlorella vulgaris</i> cloroplasto gen 16S rRNA, parcial, cepa NIES 227	0.0 (467/467*)
<i>Chlorella vulgaris</i> CS3-CS4		

No. de Acceso GenBank	Descripción de Organismo obtenido de la base de datos NCBI GenBank	Valor E
AY553213.1	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> 16S RNA ribosomal de la subunidad pequeña gen, secuencia parcial; cloroplasto	0.0 (418/418*)
<u>AB001684.1</u>	<i>Chlorella vulgaris</i> C-27 DNA cloroplasto, secuencia completa Longitud=150603	0.0 (418/418*)
<u>X16579.1</u>	<i>Chlorella vulgaris</i> chloroplast DNA cloroplasto para el RNA ribosomal subunidad pequeña	0.0 (418/418*)

Para la muestra de *C. vulgaris*, fueron correctamente amplificados 3 productos de PCR: para el fragmento amplificado NS1-NS2 el número total de pares de bases de alta calidad fueron de 494 pares de bases, en el fragmento CS1-CS2 de 467 pares de bases y en el fragmento CS3-CS4 de 418 pares de bases.

Tabla 15. Análisis molecular e identificación de secuencia de la cepa aislada. Se presentan las descripciones de secuencias nucleotídicas de microorganismos resultantes con los valores mas altos de similitud y probabilidad respecto a la secuencia de la Muestra Aislada con los tres productos de PCR (NS1-NS2, CS1-CS2, CS3-CS4) amplificados.

Muestra Aislada NS1-NS2		
No. de Acceso GenBank	Descripción del Organismo	Valor E
GQ122327.1	<i>Chlorella sorokiniana</i> aislado BE1 18S gen RNA ribosomal, secuencia parcial	0.0 (532/532*)
X62441.2	<i>Chlorella sorokiniana</i> gen 18S rRNA, cepa SAG 211-8k Longitud=1797	0.0 (532/532*)
FM205860.1	<i>Chlorella sorokiniana</i> gen rRNA 18S (parcial), ITS1, gen 5.8S rRNA, gen ITS2 y 28S rRNA (parcial), cepa CCALA 260	0.0 (532/532*)
Muestra aislada CS1- CS2		
No. de Acceso GenBank	Descripción de Organismo	Valor E
X65689.1	<i>C. sorokiniana</i> DNA plástido (16S-like) RNA ribosomal subunidad pequeña	0.0 (473/473*)
HM573453.1	<i>Chlorellaceae sp.</i> M7 16S gen RNA ribosomal, secuencia parcial; plástido	0.0 (473/473*)
Muestra Aislada CS3-CS4		
No. de Acceso GenBank	Descripción de Organismo	Valor E
HM573453.1	<i>Chlorellaceae sp.</i> M7 gen RNA 16S ribosomal, secuencia parcial; plástido	0.0 (417/417*)
X65689.1	<i>C.sorokiniana</i> plastido DNA (16S-like) RNA ribosomal subunidad pequeña	0.0 (417/417*)

Chlorella sorokiniana es la especie que presenta la más alta similitud con los resultados de la base de datos. Todas las secuencias sometidas a la base de datos obtuvieron un 100% de similitud en el número de pares de bases analizados (*).

Para la muestra Aislada, fueron correctamente amplificados 3 productos de PCR, el fragmento amplificado NS1-NS2, el número total de pares de bases de alta calidad que resultaron fueron de 532 pares de bases; el fragmento CS1-CS2 fue de 473 pares de bases y el fragmento CS3-CS4 de 417 pares de bases.

5 Discusiones generales

La tasa de fijación de CO₂ se relaciona directamente con la eficiencia de la utilización de la luz y la densidad celular de las microalgas. Por lo tanto, las mediciones de biomasa, o evaluaciones de la tasa de crecimiento, son fundamentales para evaluar el potencial de un sistema de cultivo de microalgas para la eliminación de CO₂ (Chiu *et al.*, 2008).

En el presente estudio, la productividad de biomasa se determinó como variable de respuesta, considerando que la biomasa de microalgas contiene aproximadamente el 50% de carbono en peso seco, y todo este carbono se deriva principalmente a partir del dióxido de carbono (Converti *et al.*, 2009). Jacob-Lopes (2010), reportó resultados del análisis elemental de la biomasa de microalgas, indicando que el carbón representa el 50 ± 0.7 % del peso seco de la biomasa.

La ausencia de la fase *lag* o de latencia en las curvas de crecimiento en las 3 especies de microalgas, pone de manifiesto que fue favorable cultivar los inóculos 3 días previos con 2% de CO₂, como proceso de adaptación para no desarrollar la fase de latencia y prolongar el tiempo en el fotobioreactor. Según Greque y Viera (2007), la ausencia de fase *lag* indica una buena adaptación previa a las condiciones del ensayo, especialmente a la inyección de CO₂.

De acuerdo a Cheng *et al.*, (2006) y de Morais y Costa (2007), la eficiencia de eliminación o la fijación de CO₂, en un sistema de cultivo cerrado, depende de la especie de microalgas, la concentración de CO₂ y el tipo de fotobiorreactor.

Para el ensayo experimental, se analizaron diferentes formas de suministro de CO₂ a los cultivos, como el método de alimentación de carbono, suministro constante de concentraciones variables de CO₂ y la inyección automática de CO₂. Se utilizaron, de acuerdo a la disponibilidad de equipo y a la utilización más frecuente en estudios de cultivos con CO₂.

En cuanto al sistema de cultivo, el CO₂ debe ser alimentado continuamente durante el día, y dado que los resultados de la actividad de la fotosíntesis provocan un aumento en el pH, es probable que, el método más conveniente para controlarlo, sea mediante un controlador estático que inyecte CO₂ directamente en el medio de cultivo cuando detecta una caída de pH. Este sistema contribuye al mismo tiempo en la aportación de la fuente de carbono y al control del pH en los cultivos. Según Chisty, (2007), la alimentación controlada en respuesta a las señales de los sensores de pH, minimiza la pérdida de dióxido de carbono y las variaciones de pH del medio.

Existen diversos estudios que reportan concentraciones altas de biomasa usando glucosa como fuente de carbono (Wan *et al.*, 2011), sin embargo cuando se consideran cultivos a gran escala, la economía y sustentabilidad es de principal importancia, y la utilización de CO₂ es una opción viable como fuente de alimentación.

CONCLUSIONES

Las especies de *C. vulgaris*, *S. dimorphus* y *C. sorokiniana*, obtuvieron mayor concentración celular en cultivos con aporte de CO₂ que en los cultivos control con suministro de aire.

La fuente de Carbono presente en el medio de cultivo, produjo un incremento de la concentración celular y es un factor limitante en el crecimiento de las cepas.

Las 3 especies de microalgas favorecen la biofijación de CO₂ al presentar una alta productividad que está directamente relacionada con la tasa de consumo de dióxido de Carbono.

Se identificaron de 3 secuencias de productos de PCR la muestra *C. vulgaris* UTEX 265, con referencia a la base de datos GenBank. Estas secuencias correspondieron al RNA de la subunidad pequeña ribosomal, ubicados tanto en el ADN del cloroplasto como en el núcleo, confirmándola como de ésta especie.

Se identificó molecularmente a la especie aislada de aguas residuales como la especie *Chlorella sorokiniana*, de acuerdo a las tres secuencias de la subunidad pequeña ribosomal del ADN. Estas secuencias se encuentran almacenadas en la base de datos GenBank.

La identificación de la especie *C. sorokiniana*, permite dar un paso en futuras investigaciones para la utilización de cepas autóctonas con alta productividad, auxiliares en la depuración de aguas residuales y mitigación de CO₂ de las fuentes emisoras de la Cd. de Chihuahua.

Este estudio, da la pauta para futuras investigaciones con la especie *S. dimorphus*, y ampliar esta línea de trabajo, que carece de suficiente literatura reportada. El hecho de haber encontrado alto porcentaje de proteínas en su biomasa favorece su uso, además que ésta especie posee una gran adaptación para habitar en aguas residuales con cambios en las condiciones de cultivo.

Aunque no se presenta un incremento considerable en los porcentajes de lípidos entre los tratamientos al adicionar CO₂, las 3 especies de microalgas presentan alta densidad de biomasa, lo que puede favorecer la síntesis de lípidos en condiciones específicas de estrés.

En este ensayo experimental, se reconoce el potencial de *C. sorokiniana* por su alto contenido protéico, que puede diversificar sus usos en biológica recombinante, industria alimenticia y biotecnología, por mencionar algunos.

1. Recomendaciones

Realizar cultivos con mayor tiempo de retención, para analizar el impacto del CO₂ en la composición bioquímica de las células.

Evaluar el potencial de las cepas, incrementando la concentración de CO₂.

Realizar mediciones de CO₂ en los gases de escape del biorreactor, para evitar pérdidas del gas al exterior y/o recirculación del aire, reduciendo los costos de producción y evitar la contaminación del ambiente.

Analizar los lípidos acumulados bajo la condición del suministro de CO₂, y evaluar su potencial como materia prima para biodiesel.

Analizar el valor calorífico de la biomasa resultante, para posibles usos como cogeneración de energía.

Desarrollar métodos para utilizar la biomasa resultante en diversos subproductos con valor agregado.

Conducir los cultivos con alta densidad celular a situación de estrés para inducir la síntesis de lípidos.

Promover grupos multidisciplinarios que focalicen sus esfuerzos en genética, bioingeniería, diseño de biorreactores, disminución de costos en el proceso, desarrollo de técnicas de cultivo. Así mismo, involucrar a dependencias gubernamentales y sector privado, en un proyecto fundamental para promover el tema ambiental, económico y social.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaro, H., Guedes, A. y Malcata, F. 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. Appl Energy. En prensa.
- Balat, M. y Balat, H. 2010. Progress in biodiesel processing. In Applied Energy. 87(6):1815-1835.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. 1959. Rapid Method of total Lipid Extraction and Purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37:911-917.
- Brennan, L. y Owende, P. 2010. Biodiesel from microalgae A review of technologies for productions, processing and extraction of biofuels and co- products. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14: 557-577.
- Chen, W., Sommerfeld, M. y Hu, Q. 2011. Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. Bioresource Technology 102: 135-14.
- Chen, C-Y., Yeh, K-L., Aisyah, R., Lee, D-J. y Chang, J-S. 2011. Cultivation photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. Bioresource Technology 102: 71-81.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 25:294-306.
- Chisti, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends in Biotechnology 26 (3): 126-131.
- Chiu, S., Kao, C-Y. , Chen, C-H., Kuan, T-C., Ong, S-C. y Lin, C-S. 2008. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. Bioresource Technology 99: 3389-3396.
- Converti, A., Casazza, A., Ortiz, E., Perego, P. y Del Borghi, M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. Chemical Engineering and Processing 48 : 1146-115.
- Costa, J., de Morais, M. 2010. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. Bioresource Technology. En prensa.
- de Morais, M. y Costa J. 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology 129: 439-445.
- Demirbas, A. 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. Energy Conversion and Management 50:14-34.

- Demirbas, A. 2011. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Applied Energy* 88: 3541–3547.
- Fan, L-H., Zhang, Y-T., Zhang, L. y Chen, H-L. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbondioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Membrane Science* 325 (2008) 336–345.
- Feng, Y., Li, Chao y Zhang, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology*. En prensa.
- Ge, Y., Liu, J. y Tian, G. 2010. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. *Bioresour Technol* . En prensa.
- Gouveia, L. y Oliveira, A. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 36:269–274.
- Ho, S-H., Chen, C-Y., Yeh, K-L, Chenc, W-M., Lind, C-Y., Chang, J-S. 2010. Characterization of photosynthetic carbon dioxide fixation ability of indigenous *Scenedesmus obliquus* isolates. *Biochemical Engineering Journal* 53:57–62.
- Huang, G. Chen F., Wei, D., Zhang, X. y Chen, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy* 87 (2010) 38–46.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J*54:621–39.
- Jacob-Lopes, E., Gimenes, C., Queiroz, M., Teixeira, T. 2010. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. *Energy Conversion and Management* 51: 894–900.
- Jacob-Lopes, E., Cacia, F., Teixeira, F. 2008. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* N^o ageli in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 40: 27–34.
- Jacob-Lopes, E., Gimenes, S., Ferreira, L., Teixeira, T. 2009. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing* 48: 306–310
- Khoo, H., Sharratt, P., Das, P., Balasubramanian, R., Narahariseti, P., Shaik, S. 2011. Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel:Preliminary results and comparisons. *Bioresource Technology* 102: 5800-5807.
- Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewull, J., Malcata, F y Langenhove, H. 2010. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology* 28 : 371–380 371.

- Lam, M. y Lee, K. 2012. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances* 30: 673–690
- Lee, J-K., Yoo, C., Jun S-Y., Ahn, C-Y. y Oh, H-M. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* 101 :S75–S77.
- Liu, Z., Wang, G. y Zhou, B. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 99:4717–4722.
- López, S. J., 2003. A study of the decrease in fossil CO₂ emissions of energy generation by using vegetable oils as combustible. *Building and Environment* 38. 129–133.
- Lv, J.-M., Cheng L-H, Xu X-H, Zhang L.,Chen H-L. 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*. En prensa.
- Mata,T. Martins, A. y Caetano, N. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217–232.
- Miao, X. y Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 97; 841–846.
- Moazami, M. y Colman, B. 2012.Changes in carbon uptake mechanisms in two green marine algae by reduced seawater pH. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 413: 94–99.
- Morais, M. y Costa, J.A. 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina sp.* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 129:439–445.
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A. y Bux, F. 2010. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology*. En prensa.
- Naik, S.N., Goud, V. V. , Rout P. K. y Dalai A. K. 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:578–597.
- Nigam, P. y Singh, A. 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science* 37: 52e68.
- Nigam, S., Prakash M. y Sharma, R. 2011. Effect of Nitrogen on Growth and Lipid Content of *Chlorella pyrenoidosa*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 7 (3): 124-129.
- Ono, E. y Cuello, J. 2006. Feasibility Assessment of Microalgal Carbon Dioxide Sequestration Technology with Photobioreactor and Solar Collector. *Biosystems Engineering* 95 (4): 597–606.

- Packer, M. 2009. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. *Energy Policy* 37:3428–3437.
- Powell, E.E. y Hill, G.A. 2010. Carbon dioxide neutral, integrated biofuel facility. *Energy* 35: 4582-4586.
- Pruvost, J., Vooren V., Gouic B., Couzinet-Mossion y Legrand J. 2010. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresour Technol.* En prensa.
- Sydney, E., Sturm, W., de Carvalho, J., Thomaz-Soccol V., Larroche, C., Pandey, A. y Soccol, C. 2010. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology* 101:5892–5896.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., Zhong, J. 2010. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology.* En prensa.
- Wan, M., Liu, P., Xia, J., Rosenberg, J. Oyler G., Betenbaugh, M., Nie, Z. y Qiu, G. 2011. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Appl Microbiol Biotechnol* .91:835–844.
- Widjaja, A., Chien, C-C. y Ju, Y-H., 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40 (1), 13–20.
- Yoo, C., Jun S-Y., Lee J-Y., Ahn C-Y. y Oh H-M. 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology* 101: S71–S74
- Zhao, B., Zhang, Y., Xiong, K., Zhang,Z., Hao, X. y Liu, T. 2011. Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO₂ fixation. *Chemical Engineering Research and design* 89: 1758-1762.

Richmond, Amos. 2004. *Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology.* Blackwell Science Ltd.

Arredondo, B. y Voltolina, D. 2007. *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.*

ANEXOS

1 Condiciones de reacción de la enzima polimerasa Phusion HotStar HF (Fynnzymes, New Englan Biolabs).

Para la amplificación de ácidos nucleicos de las muestras de microalgas se siguen las instrucciones de las condiciones de reacción de la enzima polimerasa Phusion HotStar HF (Fynnzymes, New Englan Biolabs), que consisten en: Preparar 50 μL finales de una reacción que contenga: 100 ng de ADN, DNTP's a una concentración final de 200 μM , oligonucleótidos a una concentración de 0.5 μM , 5 μL de amortiguador de reacción con 15 mM de Sulfato de Magnesio, como cofactor de la enzima y agua libre de nucleasas hasta 50 μL .

Temperatura y tiempo en los ciclos de la amplificación en el termociclador: se inicia con una temperatura de desnaturalización del ADN a 98 °C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos, cada uno con una temperatura de desnaturalización de 98 °C por 30 segundos; temperatura de alineación de oligonucleótidos al ADN de 55 °C por 15 segundos y de una temperatura de polimerización de 72 °C por 10 segundos. Al término de los ciclos, se efectúa una extensión final de 72 °C por 10 minutos. La temperatura de almacenamiento es a 4 °C.

2 Visualización de productos de PCR y su procesado para secuenciación

Las reacciones de PCR se mezclan con la solución de carga y se vierten en los geles de agarosa. El tamaño correcto de amplificación del producto de PCR del ADN genómico se corrobora con un estándar de ADN comercial Mass Ruler (Fermentas), para corroborar la correcta amplificación en el tamaño de las regiones nuclear y mitocondrial del ADN ribosomal de las microalgas estudiadas. Para la purificación de los productos de PCR: recuperar por medio de escisión del gel de agarosa la banda amplificada y guardar en un sobre de papel parafil, congelar a -80 °C por 30 minutos. Descongelar las muestras parcialmente y macerar, transferir un máximo de 400 mg a un cartucho de microfiltración de 1.5 ml Ultrafree (Millipore, 0.22 micrómetros) y centrifugar a 3000 x g por 15 minutos. Recuperar el filtrado y cuantificar su volumen, dependiendo de este valor integrar el ADN contenido en la solución, precipitar con 1/10 del volumen de la solución de Acetato de Sodio 3M pH 5.2, 2 volúmenes de Etanol Absoluto grado biología molecular y 0.5 µL de Glicógeno 5mg/ml (Invitrogen); mezclar las muestras gentilmente e incubar a -80 °C por al menos 1 hora, centrifugar a 20,000 x g por 30 minutos a 4 °C, desechar el sobrenadante con ayuda de una pipeta fina. Lavar el pellet formado con 1 ml de una solución al 70% de Etanol y centrifugar a 20,000 C por 5 minutos a 4 °C, desechar el sobrenadante. Secar el pellet a temperatura ambiente, hasta no observar residuos de Etanol (se verifica observando la muestra en un microscopio estereoscópico). Resuspender el pellet de ADN seco en agua grado molecular y cuantificar a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop1000.

3 Resultado de la secuenciación de oligonucleótidos de productos de PCR de las muestras *Chlorella vulgaris*.

Cebadores Usados	Secuencia (5' - 3')
<p>NS1-NS2</p> <p>494 pares de bases</p>	<p>5'TGCTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTA TAGTTTATTTGATGGTACTTACTACTCGGATACCCGTAGTAAAT CTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGAC GTATTTATTAGATAAAAGGCCGACCGGGCTTCTGCCCACTCGC GGTGAATCATGATAACTTCACGAATCCATGGCCTTGTGCCGGC GATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTGATGGTAGG ATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGG GTTTCGATTCCGGAAAGGGAGCCTGAAAAACGGCTACACATC CAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACA GGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGT CTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAACCCCTTAACGAGGAT CAATTGGAGGGCAAGTCTGGT 3'</p>
<p>CS1-CS2</p> <p>464 pares de bases analizadas</p>	<p>5'TTGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCAATGATCAGTAG CTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACG GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATTTCCGCA ATGGGCGACAGCCTGACGGAGCAATGCCGCGTGAAGGATGAA GGCCTATGGGTTGTAACTTCTTTTCTCAGAGAAGAAGCATTG ACGGTATCTGAGGAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCA GCCGCGGTAAGACAGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATT GGGCGTAAAGCGTCTGTAGGTGGCTTAAAAAGTCTCCTGTCAA AGATCAGGGCTTAACCCTGGGCCGGCAGGAGAACTCTTAGG CTAGAGTTTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGGAGCGG TGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAAAGGCGAAAGCA CT 3'</p>

<p>CS3-CS4 418 pares de bases analizadas</p>	<p>5'TGCTGGGCCATAACTGACACTGAGAGACGAAAGCGAGGGG AGCAAAGGGATTAGATAACCCCTGTAGTCCTCGCCGTAACG ATGGATACTAGATGTTGGGTAGGTTAAATCACTCAGTATCGTA GCTAACGCGTGAAGTATCCCGCCTGGGGAGTATGCTCGCAAG AGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAG GACTTGACATGCCACTTTTTCCCTGAAAGGGGAAGTTCCAGAG TGGACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTTGA GATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTTTGA ATTGCCAGTAATGGGAAATTCAAAGACTGCCGGTGAT 3'</p>
--	--

4 Resultado de las secuencias de oligonucleótidos de los productos de PCR de cepa aislada.

Cebadores usados	Secuencia (5' - 3')
<p>NS1-NS2 533 pares de bases</p>	<p>5'TTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAA ACTGCTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAA TCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGAT ACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCC CGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCC GACCGGGCTCTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAA CTTCACGAATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGTTTC ATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGAT AGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGAT TAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG CTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTA CCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAA CAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGA GTACAATCTAAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGG GCAAGTCTGGT3'</p>

<p>CS1-CS2 473 pares de bases analizadas</p>	<p>5'TGGCTGATTAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAA GGCAATGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG CAGCAGTGAGGAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGAC GGAGCAATGCCGCGTGAAGGATGAAGGCCTATGGGTTGT AACTTCTTTTCTCAGAGAAGAATCTTGACGGTATCTGAG GAATAAGCATCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTA AGACAGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGT AAAGCGTCTGTAGGTGGCTTCAAAGTCTCCTGTCAAAGA TCAGGGCTTAACCCTGGGCCGGCAGGAGAACTCTGAGG CTAGAGTTTGGTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGGAG CGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAAAGGCA AAAGCA 3'</p>
<p>CS3-CS4 417 pares de bases analizadas</p>	<p>5'CACCGGCAGTCTTTTGAATTTCCATAACTGGCAATTCA AAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT CTCAAGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTG TCCACTCTGGA ACTTCCCCTTTCAGGGAAAAAGTGGCATG TCAAGTCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATAAA CCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCT TTGAGTTTCACTCTTGCGAGCATACTCCCCAGGCGGGATA CTTCACGCGTTAGCTCCGATACTGAATGCTTTAACCTATC CAACATCTAGTATCCATCGTTTACGGCGAGGACTACAGGG GTATCTAATCCCTTTTGCTCCCCTCGCTTTCGTCTCTCA GTGTCAGTTGTGGCCAGCAG 3'</p>

